

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/00, 9/64, G01N 33/53		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/56871 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. September 2000 (28.09.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/02018 (22) Internationales Anmeldedatum: 8. März 2000 (08.03.00) (30) Prioritätsdaten: 199 10 108.6 8. März 1999 (08.03.99) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: FAHRENHOLZ, Falk [DE/DE]; An der Klosterheck 17, D-55130 Mainz (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): POSTINA, Rolf [DE/DE]; Jahnstrasse 16, D-64380 Roßdorf (DE). (74) Anwalt: ISENBRUCK, Günter; Bardehle Pagenberg Dost Altenburg Geissler Isenbruck, Theodor-Heuss-Anlage 12, D-68165 Mannheim (DE).			(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: CELLS COEXPRESSING AN AMYLOID PRECURSOR PROTEIN AND AN α -SECRETASE AND THEIR USES IN TEST METHODS AND DIAGNOSTICS (54) Bezeichnung: ZELLEN, DIE EIN AMYLOIDVORLÄUFERPROTEIN UND EIN α -SEKRETASE COEXPRIMIEREN UND DEREN ANWENDUNGEN IN TESTVERFAHREN UND DIAGNOSTIK (57) Abstract The invention relates to a recombinant cell which expresses a substrate protein comprising at least one sequence region of 18 amino acids of the human amyloid precursor protein (APP) or a homologous protein. The sequence region contains the α -secretase cleavage site as well as 6 amino acid rests at the amino terminal and 12 amino acid rests at the carboxy terminal, in relation to the α -secretase cleavage site, and contains either a) a recombinant nucleic acid comprising at least one gene for a protease protein which contains either the sequence region(s), required for proteolytic action, of the disintegrin metalloprotease ADAM 10 obtained from cattle (<i>Bos taurus</i>), humans or another mammal or represents a mutein of a mammalian disintegrin metalloprotease ADAM 10 which has essentially the same enzymatic properties, the gene or genes being controlled by a heterologous promotor; or b) heterologous RNA coding for a substrate protein and a protease protein. The invention also relates to the use of the above cells. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft eine rekombinante Zelle, die ein Substratprotein exprimiert, das mindestens einen Sequenzbereich von 18 Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP, amyloid precursor protein) oder eines homologen Proteins umfasst, wobei der Sequenzbereich die α -Sekretasespaltstelle sowie 6 Aminosäurereste aminoterminal und 12 Aminosäurereste carboxyterminal bezogen auf die α -Sekretasespaltstelle enthält, und a) entweder rekombinante Nukleinsäure enthält, umfassend mindestens ein Gen für ein Proteaseprotein, das entweder mindestens den/die für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich oder Sequenzbereiche der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (<i>Bos taurus</i>), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier umfasst oder ein Mutein einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 darstellt, das im wesentlichen die gleichen enzymatischen Eigenschaften besitzt, wobei das Gen oder die Gene unter der Kontrolle eines heterologen Promotors stehen, b) oder heterologe RNA codierend für ein Substratprotein und für ein Proteaseprotein. Die Erfindung betrifft weiterhin diverse Anwendungen der Zellen.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

5

ZELLEN, DIE EIN AMYLOIDVORLÄUFERPROTEIN UND EIN α -SEKRETASE COEXPRIMIEREN UND DEREN ANWENDUNGEN IN TESTVERFAHREN UND DIAGNOSTIK

10

Die Erfindung betrifft zunächst Zellen, die rekombinierte Nukleinsäure(n) enthalten, die ein Amyloidvorläuferprotein (APP) und eine α - Sekretase codieren, oder
15 zumindest Teile der genannten Proteine, ferner ein Testverfahren zur Identifikation von α -Sekretase-aktiver Substanzen sowie eines zur Identifikation weiterer Sekretasen, schließlich auch ein Verfahren zur Bestimmung der Anfälligkeit gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere gegenüber *Morbus Alzheimer* sowie die Verwendung von Nukleinsäuren, die für eine α -Sekretase codieren, für
20 die Gentherapie.

Morbus Alzheimer ist die häufigste Ursache für Demenz in der westlichen Welt und die vierthäufigste Todesursache in den USA.

Die *Alzheimer*-Inzidenz steigt mit dem Alter: 1 bis 5 % der Menschen über 65 und
25 10 bis 20 % über 80 sind betroffen.

Alzheimer ist neuropathologisch durch die Anwesenheit einer Vielzahl von neuritischen Plaques und neurofibrilären Fehlstrukturen gekennzeichnet, die zu einem massiven Verlust an Neuronen führt. Weder die Plaques noch die neurofibrilären Fehlstrukturen sind spezifisch für *Alzheimer* – sie kommen bei älteren, intellektuell unauffälligen Personen und bei gewissen anderen Krankheiten ebenfalls vor.
30 Allerdings sind diese Strukturen bei *Alzheimer* zahlreicher und weiter verbreitet als bei nicht betroffenen Individuen. Während Plaques extrazellulär auftreten,

findet man die neurofibrilären Fehlstrukturen in degenerierenden Neuronen. Der Hauptbestandteil der Plaques ist ein 39-43 Aminosäure (4kDa) großes Peptid, genannt β -Amyloid oder einfach β -Peptid ($A\beta$). Ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, Tau, ist der Hauptbestandteil der neurofibrilären Fehlstrukturen (Überblick: Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine, Band 1, Seiten 42 bis 52, Herausgeber Meyers, Robert A., VCH Verlag Weinheim)

Das β -Peptid ($A\beta$) stammt von dem Amyloidvorläuferprotein (amyloid precursor protein, APP) ab, einem Typ 1 Transmembranprotein, das in vielen Säugerzelltypen exprimiert wird.

Die $A\beta$ -Sequenz umfaßt 28 Aminosäuren des extrazellulären und 12 bis 15 Aminosäurereste des membrandurchspannenden Teils von APP. $A\beta$ wird aus APP mittels proteolytischer Prozessierung durch eine bisher nicht identifizierte Protease gebildet, der β -Sekretase, die am Aminoterminal schneidet und durch die am C-Terminus schneidende γ -Sekretase.

Der Hauptabbauweg von APP ist der konstitutive sekretorische Weg, der die Spaltung des Proteins innerhalb der $A\beta$ -Sequenz durch eine putative α -Sekretase an der Zelloberfläche (Sisodia, S.S., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, Seiten 6075 bis 6079; Haass et al. (1992) Nature 357, Seiten 500 bis 503; Ikezu et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, Seiten 10485 bis 10495) und im Trans-Golgi-System (Kuentzel et al. (1993) Biochem. J. 295, Seiten 367 bis 378; De Strooper et al. (1993) J. Cell Biol. 121, Seiten 295 bis 304; Sambamurti et al. (1992) J. Neurosci. Res. 33, Seiten 319 bis 329; Haass, et al. (1995) J. Cell. Biol. 128, Seiten 537 bis 547; Tomita et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, Seiten 6277 bis 6284) umfaßt. Lösliche aminoterminalen APP-Fragmente von 105 bis 125 kDa (sogenannte APP α -Fragmente; Weidemann et al. (1989) Cell 57, Seiten 115 bis 126; Evin et al. (1994) Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 1, Seiten 263 bis 280) werden ins extrazelluläre Medium freigesetzt. Das membrangebundene 10kDa große carboxyterminale Fragment (p10), das bei der α -Sekretase-Spaltung ebenfalls entsteht, enthält nur einen Teil des amyloidogenischen $A\beta$ -Peptids und kann durch die γ -

Sekretase zu einem 3kDa-Fragment (p3) weiter abgebaut werden (Haass et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, Seiten 3021 bis 3024). Da der Abbau von APP durch eine α -Sekretase zu keinem intakten A β -Peptid führt, ist er nicht amyloidogenisch, d.h. er führt nicht zur Bildung von Amyloidplaques und somit nicht zu

5 *Morbus Alzheimer*.

Aus diesem Grund steht der α -Sekretase-Abbau von APP seit Jahren im Fokus des Forscherinteresses. Durch Boseman et al. (1994) (J. Biol. Chem. 269, Seiten 3111 bis 3116) wurde ein Fusionsprotein aus dem aminotermialen Teil von APP

10 und einer alkalischen Phosphatase in H4-Zellen heterolog exprimiert, um die endogene α -Sekretaseaktivität dieser Zellen zu untersuchen und gegebenenfalls das entsprechende Protein zu identifizieren. Hierbei wurde der unter verschiedenen Bedingungen freigesetzte Anteil an Proteolyseprodukt mit Antikörpern bestimmt, die gegen alkalische Phosphatase gerichtet waren. Diese Versuche führten bisher

15 nicht zur Identifikation der α -Sekretase. Vermutlich ist die Menge an endogener α -Sekretase zu gering, als daß eine direkte Isolierung und Identifikation der α -Sekretase möglich wäre.

Es ist Aufgabe der Erfindung, Zellen bereitzustellen, die in der Lage sind, ein

20 Amyloidvorläuferprotein und eine α -Sekretase in ungewöhnlich großer Menge zu exprimieren. Eine weitere Aufgabe ist es, Zellen bereitzustellen, deren endogene α -Sekretaseaktivität vermindert ist. Es ist ferner Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur Auffindung pharmazeutischer Wirksubstanzen anzugeben, die in den α -Sekretasestoffwechsel eingreifen, sowie ein Verfahren zur Identifizierung weiterer Sekretasen. Schließlich ist Aufgabe der Erfindung, ein weiteres Verfahren

25 zur Bestimmung der Anfälligkeit gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere gegenüber *Morbus Alzheimer* anzugeben sowie ein Arzneimittel gegen neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere gegen *Morbus Alzheimer* bereitzustellen. Ferner sollen Tiermodelle wie transgene nicht-menschliche Tiere

30 zum Studium von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere von *Morbus Alzheimer* bereitgestellt werden.

Die Erfindung besteht in einer rekombinanten Zelle, die

ein Substratprotein exprimiert, das mindestens einen Sequenzbereich von 18 Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP, amyloid precursor protein) oder eines homologen Proteins umfaßt, wobei der Sequenzbereich die α -Sekretasespaltstelle sowie 6 Aminosäurereste aminoterminal und 12 Aminosäurereste carboxyterminal bezogen auf die α -Sekretasespaltstelle enthält, und

- entweder rekombinante Nukleinsäure enthält, umfassend mindestens ein Gen für ein Proteaseprotein, das entweder mindestens den/die für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich oder Sequenzbereiche der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier umfaßt oder ein Mutein einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 darstellt, das im wesentlichen die gleichen enzymatischen Eigenschaften besitzt, wobei das Gen oder die Gene unter der Kontrolle eines heterologen Promotors stehen,
- oder heterologe RNA codierend für ein Substratprotein und für ein Proteaseprotein.

Eine weitere Ausführungsform betrifft eine rekombinante Zelle, die rekombinante Nukleinsäure enthält, umfassend entweder

- mindestens ein Gen für ein Substratprotein, das mindestens einen Sequenzbereich von 18 Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP, amyloid precursor protein) oder eines homologen Proteins umfaßt, wobei der Sequenzbereich die α -Sekretasespaltstelle sowie 6 Aminosäurereste aminoterminal und 12 Aminosäurereste carboxyterminal bezogen auf die α -Sekretasespaltstelle enthält, und
- mindestens ein Gen für ein Proteaseprotein, das entweder mindestens den/die für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich oder Sequenzbereiche der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier umfaßt oder ein Mutein einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 darstellt, das im wesentlichen die gleichen enzymatischen Ei-

genschaften besitzt, wobei das Gen oder die Gene unter der Kontrolle eines heterologen Promotors stehen,
oder heterologe RNA codierend für ein Substratprotein und für ein Proteaseprotein.

5

- Es wurde überraschenderweise gefunden, daß die an sich schon bekannte Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 die Eigenschaften der authentischen α -Sekretase aufweist. Die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind wurde zuerst
10 von Chantry et al. (1989) (J. Biol. Chem. 264, Seiten 21603 bis 21607) gereinigt und von Howard et al. (1996) (Biochem. J. 317, Seiten 45 bis 50, GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer Z21961) kloniert. Auch das Homologe des Menschen ist kloniert (Rosendahl et al. (1997), J. Biol. Chem. 272 (39), Seiten 24588 bis 24593, GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer AF009615).
- 15 Es war bisher unbekannt, was das natürliche Substrat beider Enzyme *in vivo* ist. Es wurde nun gefunden, daß die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10, soweit bisher bekannt, alle Eigenschaften der α -Sekretase aufweist, wodurch es nun möglich ist, Zellen herzustellen, die α -Sekretase zusammen mit APP in großen Mengen exprimieren.
- 20 Die erfindungsgemäßen Zellen sind vorzugsweise Säugerzellen, die mit Vektoren, die Nukleinsäuresequenzen enthalten, die für das Substratprotein und für das Proteaseprotein codieren, auf bekannte Weise stabil oder transient transfiziert wurden (bezüglich Transfektion siehe Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, New York, USA). Es kann wahlweise ein
25 einziger Vektor verwandt werden, der die Expression zweier Proteine ermöglicht (z.B. pIRESneo, Clontech, Palo Alto, California, USA) oder ein Gemisch aus zwei Vektoren, von denen jeder die Expression eines Proteintyps bewirkt. Alternativ können die Nukleinsäuren, die für das Substratprotein bzw. für das Proteaseprotein codieren, jeweils getrennt voneinander stabil oder transient transfiziert
30 werden. Außerdem kommen virale Expressionssysteme, z.B. solche die auf SV40-Viren basieren, in Frage.

Ein anderes geeignetes Expressionssystem stellt die Injektion eines RNA-Gemisches in *Xenopus* Oocyten dar. In diesem Fall wird DNA, die für das erste bzw. zweite Protein codiert, in geeignete Vektoren kloniert, *in vitro*-transkribiert und als Transkriptgemisch in *Xenopus* Oocyten injiziert. In diesem Fall handelt es
5 sich bei dem Begriff „rekombinante Nukleinsäure“ um heterologe RNA. Der Begriff „heterologe RNA“ bedeutet im Rahmen der Erfindung, daß die RNA sich von der endogenen RNA unterscheidet, da sie aus einem anderen Organismus stammt. Üblich ist es, in *Xenopus* Oocyten RNA zu injizieren, die aus Säugerzellen stammt, also heterolog in bezug auf *Xenopus* ist.

10

Auch Pflanzenzellen sind schon erfolgreich als Wirtszellsystem eingesetzt worden (Lüring und Witzeman (1995) FEBS. Lett. 361 (1), Seiten 65 bis 69). Ferner kann es sich bei der Zelle auch um eine Hefe, eine Insektenzelle oder um eine Bakterienzelle handeln.

15

Die erfindungsgemäßen Zellen, weisen den Vorteil auf, daß die α -Sekretase in solch gleichbleibend hoher Konzentration gebildet werden kann, daß der Nachweis des Proteolyseproduktes in reproduzierbarer und einfacher Weise erfolgen kann.

20 Dieser Vorteil wird dadurch bewirkt, daß durch entsprechende Wahl der rekombinanten Nukleinsäure(n) die Menge an Transkripten, die für das Proteaseprotein codieren, gesteuert werden kann. In der erfindungsgemäßen Zellen wird das Proteaseprotein also unter Zuhilfenahme rekombinater Methoden erzeugt.

Damit die Funktion der Protease verfolgt werden kann, müssen die erfindungsgemäßen Zellen ein Substratprotein exprimieren. Dies kann endogen erfolgen, das
25 heißt der verwendete Zelltyp stellt natürlicherweise das Substratprotein über eine ausreichende Zeitspanne im Lebenslauf einer Zelle her, die die Beobachtung der Funktion der Protease zuläßt. Hierbei ist zu beachten, daß das Substratprotein von praktisch jeder Säugerzelle gebildet zu werden scheint. Insbesondere exprimieren
30 auch Zellen aus Zelllinien wie HEK 293 ein Substratprotein (siehe Beispiel 8).

Auf besonders effektive Weise wird das Substratprotein durch rekombinante Methoden bereitgestellt. Hierdurch kann Substratprotein in weit größerer Menge produziert werden als dem endogenen Proteinspiegel entspricht (siehe Beispiel 11).

5

Es werden in der Regel Expressionsvektoren eingesetzt, die besonders starke Promotoren wie den Cytomegalie-Viruspromotor (CMV-Promotor) oder einen induzierbaren Promotor wie den MMTV-LTR-Promotor (Lee et al. (1981) Nature 294, Seite 228) besitzen. Diese Promotoren bewirken eine reproduzierbare und vergleichsweise starke Transkription der Gene, die für das Substratprotein bzw. das Proteaseprotein codieren.

Erfindungsgemäß ist es erforderlich, daß die rekombinate Zelle rekombinante Nukleinsäure(n) enthält, die mindestens ein für ein Proteaseprotein codierendes Gen aufweisen. Das Gen oder die Gene sind unter der Kontrolle eines heterologen Promotors, das heißt unter der Kontrolle eines Promotors, der die betreffenden Gene in ihrer natürlichen genetischen Umgebung nicht kontrolliert (Fremd-Promotor).

20 Vorzugsweise weisen die rekombinanten Nukleinsäure(n) zusätzlich ein Gen auf, das für ein Substratprotein codiert.

Umfaßt die rekombinante Nukleinsäure(n) Gene, die für ein Substratprotein und ein Proteaseprotein codieren, so stehen mindestens das für ein Proteaseprotein codierende Gen, vorzugsweise aber beide Gene, d.h. das Gen für das Substratprotein und das Gen für das Proteaseprotein, unter der Kontrolle eines heterologen Promotors.

Der Begriff Gen bezeichnet im Rahmen der Erfindung einen DNA-Abschnitt aus dem Genom einer Zelle, der für ein bestimmtes Protein oder Polypeptid codiert. Dieser Begriff erstreckt sich im Rahmen der Erfindung und abweichend vom normalen Sprachgebrauch auch auf die korrespondierende cDNA des Genomab-

30

schnitts. Die korrespondierende cDNA kann auf eine mRNA zurückgehen, die vollständig oder unvollständig gespleißt ist.

5 Andererseits kann durch die erwähnte Injektion *in vitro* transkribierter heterologer RNA in *Xenopus* Oocyten der Transkript-Spiegel direkt kontrolliert werden. Durch Steuerung des Transkriptspiegels gelingt eine Steuerung der Translation, also letztlich eine Steuerung der Menge an Genprodukt in der Zelle.

Bei dem Substratprotein handelt es sich entweder um das humane Amyloidvorläuferprotein (APP, amyloid precursor protein, Schilling et al. (1991) Gene 98, Seiten 225 bis 230, GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer X06989, Y00297) oder um ein homologes Protein aus einem anderen Organismus, das über mindestens 770 Aminosäuren mit dem humanen Gegenpart einer Sequenzidentität von 86 % auf Aminosäureebene aufweist. Das Protein kann auch jeweils nur einen
15 Teil des APPs umfassen, der mindestens die putative α -Sekretasespaltstelle, bestimmt durch Esch et al. (1990) Science 248, Seiten 1122 bis 1124, umfaßt sowie die Bereiche des APP, die an der Erkennung der Spaltstelle durch die α -Sekretase beteiligt sind (siehe z.B. Sisodia (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, Seiten 6075 bis 6079). Das Wort Spaltstelle oder Schnittstelle bezeichnet den zwischen
20 zwei Aminosäuren einer Proteinsequenz gelegenen Ort, an dem durch die Spaltung neue Termini entstehen. Durch Erzeugung von APP-Deletionsmutanten läßt sich auf einer dem Fachmann bekannten Weise die Erkennungsregion auf dem APP identifizieren. Das Substratprotein umfaßt somit in der Regel einen Sequenzbereich des APP oder eines Homologen, der die α -Sekretaseschnittstelle sowie die
25 α -Sekretaseerkennungsregion beinhaltet. Hierbei wird ein Sequenzbereich von 6 Aminosäureresten, insbesondere von 36 Aminosäureresten aminoterminal und von 12 Aminosäureresten, insbesondere 83 Aminosäureresten carboxyterminal bezogen auf die α -Sekretaseschnittstelle bevorzugt. Im Prinzip sind aber alle Proteine geeignet, die den Sequenzbereich aufweisen, der an der Erkennung der
30 Spaltstelle durch die α -Sekretase beteiligt ist.

Das Proteaseprotein umfaßt mindestens den für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*) oder aus dem Menschen oder eines homologen Proteins. Alternativ kann das Proteaseprotein auch durch Mutation (Insertion, Deletion oder Austausch von Aminosäuren) aus einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 hervorgehen (Mutein bedeutet mutiertes Protein), solange die enzymatischen Eigenschaften im wesentlichen erhalten bleiben, das heißt denen des Wildtyps im wesentlichen entsprechen. Die Disintegrin-Metalloproteasen ADAM 10 aus Mensch und Rind sowie aus Maus und Ratte sind bevorzugt. Daneben fallen auch homologe Proteine unter die Definition des Proteaseproteins, die über 824 Aminosäuren mit der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind oder dem Menschen eine Sequenzidentität von 21 %, bevorzugt von 41 %, insbesondere von 61 %, vor allem von 81 %, am stärksten bevorzugt von 94 % auf Aminosäureebene aufweisen. Bevorzugt umfaßt das Proteaseprotein den Sequenzbereich von 213 bis 455, insbesondere von 213 bis 748, vor allem von 1 bis 748 bezogen auf die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 des Rinds in der maximal langen Form (*full length*) bzw. den Sequenzbereich von 213 bis 455, insbesondere von 213 bis 748 vor allem von 1 bis 748 bezogen auf die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 des Menschen in der maximal langen Form (*full length*).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Auffindung pharmazeutischer Wirksubstanzen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellung eines oben beschriebenen Substratproteins,
- b) Bereitstellung eines oben beschriebenen Proteaseproteins,
- c) Applikation einer Testsubstanz auf eine Zelle, auf eine Zellfraktion oder auf ein Gemisch von Zellfraktionen, die jeweils sowohl das Substratprotein als auch das Proteaseprotein umfassen, und
- d) Quantitative Bestimmung eines seit der Applikation der Testsubstanz gebildeten Proteolyseproduktes des Substratproteins.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren ist es möglich, auf einfache und reproduzierbare Weise den Effekt von pharmazeutischen Wirksubstanzen auf die α -Sekretaseaktivität zu testen und auf diese Weise nach pharmazeutischen Wirksubstanzen mit vorteilhaften Wirkungen zu suchen. Zu den vorteilhaften Wirkungen, die bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere *Morbus Alzheimer* von Interesse sein könnte, gehört insbesondere die Stimulation der α -Sekretaseaktivität der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit die Verwendung von Substanzen, die die von der Zelle gebildete Proteinmenge oder die enzymatische Aktivität eines Proteaseproteins beeinflussen, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere von *Morbus Alzheimer*.

Die Bereitstellung eines Substratproteins und eines Proteaseproteins wird in der Regel durch zeitgleiche Coexpression beider Proteine in den geeigneten Wirtszellsystemen auf bekannte Art und Weise bewerkstelligt. Gegebenenfalls ist die Induktion der Expression notwendig (bei induzierbaren Promotoren wie MMTV-LTR). Wurden Zellen transient transfiziert oder RNA injiziert, so werden die Zellen zum Zeitpunkt der höchsten Expressionsdichte entnommen.

Das Verfahren kann mit intakten Zellen durchgeführt werden. In diesem Falle wird die Testsubstanz dem Kulturmedium zugegeben und die seit der Zugabe der Testsubstanz gebildete Menge an Proteolyseprodukt des Substratproteins im Zellüberstand bestimmt. Alternativ können die Zellen aufgebrochen werden, wobei die Testsubstanz einer Zellfraktion oder einer Mischung aus Zellfraktionen zugesetzt wird, die sowohl das Substratprotein als auch das Proteaseprotein umfaßt. Sollen Zellfraktionen eingesetzt werden, so ist es theoretisch auch möglich, Substratprotein und Proteaseprotein getrennt in zwei Zelllinien zu exprimieren, die Zellen aufzubrechen und die Membranfraktionen zu vereinigen. Bei Einsatz von Zellfraktionen erfolgt die quantitative Bestimmung des seit der Applikation der Testsubstanz gebildeten Proteolyseproduktes nach Zentrifugation der Probe im Membranüberstand.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteaseproteins zur proteolytischen Spaltung eines erfindungsgemäßen Substratproteins.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine rekombinante Zelle enthaltend eine rekombinante Nukleinsäure(n), die codieren:

a) für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier und

- 10 b) gegebenenfalls für ein Substratprotein.

Dominant negative Formen der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 können durch Punktmutation in einem besonders konservierten Bereich, insbesondere im aktiven Zentrum des Enzymes, erhalten werden. Ein Beispiel für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 ist die Mutante E384A
15 der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 des Rindes, die in den Beispielen beschrieben und hier besonders bevorzugt ist. Entsprechende Mutanten aus Mensch oder einem anderen Säugetier sind ebenfalls bevorzugt. Die rekombinanten Zellen weisen den Vorteil auf, daß durch die Expression der dominant negativen Form die endogene α -Sekretaseaktivität fast vollständig ausgeschaltet, was sich in einer
20 verminderten proteolytischen Spaltung des ebenfalls exprimierten Amyloidvorläuferproteins äußert. Dies erleichtert die Suche nach neuen Sekretasen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Auffindung weiterer Sekretasen oder pharmazeutischer Wirksubstanzen, umfassend die folgenden
25 Schritte

- a) Expression eines Substratproteins und einer dominant negativen Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier in einer oben beschriebenen Zelle.

- b) Expression eines weiteren Testproteins in der Zelle und/oder Applikation einer Testsubstanz auf die Zelle oder auf eine Zellfraktion dieser Zelle, und
- c) Quantitative Bestimmung eines gebildeten Proteolyseproduktes des Substratproteins.

5

Dies Verfahren beruht auf der Erkenntnis, daß eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 die endogene α -Sekretaseaktivität einer Zelle, die dieses Protein exprimiert, unterdrückt. Erfindungsgemäß werden in diesem Verfahren nur Zellen oder Zellmembranen verwendet, die die dominant negative Form aufweisen.

10

Das Testprotein wird unter Anwendung der dem Fachmann bekannten Techniken in derselben Zelle exprimiert, die auch das Substratprotein und die dominant negative Form coexprimiert. Bei dem Verfahren wird geprüft, ob die Expression des Testproteins die Menge pro Zeiteinheit gebildeten Proteolyseprodukt des Substratproteins erhöht. Ist dies der Fall, so ist dies ein starker Hinweis darauf, daß es sich bei dem Testprotein um eine Sekretase handelt, die sich von der α -Sekretase bzw. von der Disintegrin-Metalloproteinase ADAM 10 unterscheidet. Durch Versuche mit künstlichen Peptiden (etwa gemäß Fig. 3) läßt sich klären, ob das Testprotein selber eine Protease/Sekretase ist oder die Aktivität einer Protease nur

15

20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer dominant negativen Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier oder einer Nukleinsäure, codierend für eine dieser dominant negativen Formen, zur Unterdrückung der α -Sekretaseaktivität einer Zelle.

30

Bei einer bevorzugten Form einer erfindungsgemäßen Zelle codiert eine rekombinante Nukleinsäure ein Substratprotein, das ein Fusionsprotein aus einem Marker-

protein oder einem Enzym und dem Amyloidvorläuferprotein darstellt. Der aminoterninale Sequenzbereich des Fusionsproteins wird von dem Markerprotein (wie GFP, *Green fluorescent Protein*), einem Enzym oder dem katalytisch wirksamen Teil eines Enzyms und der carboxyterminale Sequenzbereich vom Amyloidvorläuferprotein oder einem Teil des Amyloidvorläuferproteins gebildet.

Bei einer bevorzugten Form der erfindungsgemäßen Zelle handelt es sich bei dem Enzym um die alkalische Phosphatase SEAPs, der gegenüber der Wildtyp-Variante SEAP die 24 carboxyterminalen Aminosäuren fehlen (SEAP : Soluble Human Secreted Alkaline Phosphatase). Diese SEAP-Variante ist verkürzt, um die Anheftung des Enzyms über GPI-Kopplung zu verhindern. Nukleinsäure, die für SEAP codiert, ist kommerziell erhältlich (pSEAP, Tropix Corp., Belford, Massachusetts, USA, Genbank-Zugangsnummer U09660).

Bei einer bevorzugten Form der erfindungsgemäßen Zelle codiert einer rekombinante Nukleinsäure für ein Substratprotein, das eine Sequenz gemäß SEQ ID-No.:1 aufweist. Dieses Protein stellt ein Fusionsprotein aus SEAPs und den 119 carboxyterminalen Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP₁₁₉) dar. Dieses Protein wird z.B. von einer Nukleinsäure gemäß SEQ ID-No.:2 codiert. Diese Nukleinsäure kann Bestandteil eines Expressionsvektors sein z.B. gemäß Vektor 136.1 (pcDNA3-SEAPs/APP₁₁₉, siehe Fig. 1) oder gemäß Vektor 137.11 (pcDNA3-SEAPs/APP₁₁₉_ADAM10-HA, siehe Fig. 2).

Bei einer bevorzugten Ausführungsform eines der erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die quantitative Bestimmung des Proteolyseproduktes durch einen enzymatischen Test, bei dem von der katalytischen Aktivität der Probe auf die Menge an Proteolyseprodukt geschlossen wird. Dies Verfahren kann z.B. unter Verwendung von erfindungsgemäßen Zellen durchgeführt werden, die ein Substratprotein gemäß SEQ ID-No.:1 exprimieren. Durch die α -Sekretaseaktivität der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 wird der aminoterninale Teil des Substratproteins abgespalten. Da dieses Proteolyseprodukt alkalische Phosphataseaktivität hat, läßt es sich im Zell- oder Membranüberstand z.B. durch Chemilumineszenz

nachweisen. Hierbei können handelsübliche Testsysteme wie Phospha-Light[™] von Tropix Corp. (Belford, Massachusetts, USA) verwandt werden.

Die Abtrennung des Zellüberstands oder des Zellmembranüberstands nach Applikation der pharmazeutischen Wirksubstanz hat so zu erfolgen, daß sich die spezifische enzymatische Aktivität des Proteolyseproduktes durch den Abtrennvorgang
5 nicht ändert oder sich in reproduzierbarer Weise ändert, so daß Proteolyseproduktmenge und katalytische Aktivität korreliert werden kann.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform eines der erfindungsgemäßen
10 Verfahren erfolgt die quantitative Bestimmung des Proteolyseproduktes durch einen spektroskopischen Test (wie Fluorometrie), bei dem von der spektroskopischen Eigenschaft einer Probe (wie Fluoreszenz) auf die Menge an einem bestimmten Proteolyseprodukt in der Probe geschlossen wird. Diese Ausführungsform bietet sich an, wenn das Substratprotein ein Fusionsprotein aus einem fluoreszeierenden Protein (wie GFP) und dem Amyloidvorläuferprotein darstellt.
15

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verfahrenen zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere für *Mobus Alzheimer*. Bei diesem Verfahren wird eine DNA-Probe der Testperson unter Einsatz
20 genspezifischer Primer gegen die humane Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 der Polymerasekettenreaktionsanalyse (PCR-Analyse, PCR-Reaktion) unterworfen, das Amplifikationsprodukt ggf. sequenziert und die Sequenz des Amplifikationsproduktes mit der bekannten Sequenz der humanen Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 verglichen. Die Anzahl und Position der Sequenzunterschiede, die sich in einer anderen Aminosäureabfolge äußert, läßt Rückschlüsse
25 auf den Risikofaktor für neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere für *Mobus Alzheimer* zu. Hierbei wird angenommen, daß Sequenzunterschiede, die zu einer Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10-Variante mit beeinträchtigter α -Sekretaseaktivität führen, eine Prädisposition für neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer* zur Folge haben. Ferner kann das Amplifikationsprodukt einer Schmelzpunktanalyse unterzogen und auch auf diese
30 Weise mit der bekannten Sequenz verglichen werden. Für diesen Zweck werden

Temperaturgradienten-Gelelektrophorese und fluoreszenzspektroskopische Methoden eingesetzt (z.B. TGGE-System der Fa. Biometra, LightCycler™ der Fa. Hoffmann-LaRoche). Darauf aufbauend können spezifische Gensonden gegen humanes ADAM 10 oder dessen mutierte Varianten für diagnostische Zwecke
5 eingesetzt werden (z.B. im Rahmen der FISH-Technik (*fluorescent in situ hybridisation*) oder mit Hilfe von DNA-Chips). Als Gensonden kommen Nukleinsäure- oder Peptid-Nukleinsäureoligomere in Betracht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere für *Morbus*
10 *Alzheimer*, wobei

- a) eine DNA-Probe der Testperson unter Einsatz genspezifischer Primer gegen die humane Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 der PCR-Analyse unterworfen wird,
- b) und die Sequenz des Amplifikationsproduktes mit der bekannten Sequenz
15 der humanen Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 verglichen wird.

Mit Hilfe von Gensonden wurde der chromosomale Lokus von humanem ADAM 10 auf Chromosom 15 bei 12.44 cR3000 zugeordnet (Yamazaki et al. (1997) *Genomics* 45, Seiten 457-459). Durch chromosomale Translokation oder auch durch
20 Alleldeletion in Chromosomen (Bsp. Tumorsuppressor p53) kann es zu einem Aktivitätsverlust von Genprodukten kommen. Es ist daher nicht auszuschließen, daß neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere *Morbus Alzheimer* durch einen Aktivitätsverlust der ADAM 10-Protease bedingt wird, welcher aus einer chromosomalen Veränderung resultiert. Durch Verwendung von ADAM 10-
25 Gensonden ließe sich ein Fehlen oder eine falsche Lokalisierung des ADAM 10-Gens bestimmen und als diagnostischer Parameter einer Prädisposition für neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer* nutzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere für *Morbus*
30 *Alzheimer*, wobei die tatsächliche chromosomalen Lokalisierung des Gens der

Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 mit seiner normalen chromosomalen Lokalisierung, Chromosom 15 bei 12.44 cR₃₀₀₀, verglichen wird.

Eine Verringerung der Aktivität der ADAM 10-Protease kann darüber hinaus
5 durch eine verminderte Transkription des ADAM 10-Gens bedingt werden. Die Effizienz der Transkription des ADAM 10-Gens läßt sich durch die Quantifizierung der ADAM 10-mRNA ermitteln und als Parameter bei der Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere von *Morbus Alzheimer* oder auch zur Diagnose einer Prädisposition dieser Krankheiten nutzen. Dazu muß die
10 ADAM 10-mRNA aus Zell- oder Gewebeproben isoliert und quantifiziert werden. Zur direkten Quantifizierung der mRNA bietet sich die sogenannte Northern-Blot-Analyse an. Eine z.B. radioaktiv markierte, zur ADAM 10-mRNA komplementäre Nukleinsäuresonde hybridisiert dabei mit der ADAM 10-mRNA. Die Menge an spezifisch gebundener Sonde wird anschließend, nach den dem Fachmann be-
15 kannten Methoden, quantifiziert. Die ADAM 10-mRNA kann nach bekannten Methoden zunächst in einzelsträngige, komplementäre DNA und dann in doppelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt werden. Sowohl die einzelsträngige als auch die doppelsträngige DNA läßt sich durch dem Fachmann bekannte Methoden, wie z.B. Echtzeit-PCR, DNA-Mikro-Array-Analyse, DNA
20 Chiptechnologie etc., quantifizieren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer*, durch quantitative Bestimmung der mRNA-Mengen von humanem ADAM 10 aus Zell- und Gewebeproben, umfassend einen der folgenden Schritte:

- 25 a) Isolierung und Quantifizierung der ADAM 10-mRNA,
 - b) Einzel- oder doppelsträngige cDNA die ADAM 10-mRNA umgeschrieben wird welche dann quantifiziert wird,
 - c) die ganze Nukleotidsequenz von ADAM 10 oder Teile davon zur Quantifizierung mittels Hochdurchsatz-Expressionsanalyse (z.B. DNA-Chip-Technologie u. DNA-Micro-Array) eingesetzt wird.
- 30

Die α -Sekretaseaktivität von ADAM 10 läßt sich durch Aktivatoren der Proteinkinase C stimulieren. ADAM 10 besitzt in seinem Carboxylterminus einen Threoninrest in Aminosäureposition 719 (T719), welcher eine Proteinkinase C-Phosphorylierungsstelle darstellt. Es ist naheliegend, daß die Aktivität von ADAM 10 durch Phosphorylierung an Threonin 719 gesteigert wird. Für den Aktivitätsverlust von ADAM 10 könnte daher eine fehlende, oder zumindest eine verminderte, Phosphorylierung von ADAM 10 verantwortlich sein. Methoden, mit denen der Phosphorylierungsgrad von ADAM 10 bestimmt werden kann, können daher zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere von *Morbus Alzheimer* und zur Diagnose einer Prädisposition dieser Krankheiten angewendet werden. Die Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades von ADAM 10 kann an Zell- oder Gewebeproben durchgeführt werden oder auch an aus diesen Proben isoliertem ADAM 10 erfolgen. Durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließenden Elektrotransfer kann ADAM 10, getrennt von anderen Proteinen einer Zell- oder Gewebeprobe, auf proteinbindenden Membranen dargestellt werden. Die Phosphorylierung von ADAM 10 läßt sich anschließend, gegebenenfalls nach Tryptischem-Verdau, durch Massenspektrometrie, durch Anti-Phosphothreonin-Antikörper oder durch noch zu entwickelnde Anti-Phospho-ADAM 10-Antikörper quantifizieren. Mit den gleichen Methoden läßt sich auch der Phosphorylierungsgrad von gereinigtem ADAM 10 ermitteln. Es können auch Experimente herangezogen werden, mit denen man die Menge an Phosphothreonin bestimmt, bzw. bei denen man eine Dephosphorylierung von Phospho-ADAM 10 nach bekannten Methoden quantitativ durchführt (Ausubel et al. (Hrsg.) (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit Verfahren zur Bestimmung des Aktivitätszustands von humanem ADAM 10 durch Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades von humanem ADAM 10 in Zell- und Gewebeproben, wobei entweder

- 5 a) ADAM 10 isoliert wird und sein Phosphorylierungsgrad entweder durch Massenspektrometrie, durch spezifische Anti-Phosphothreonin-Antikörper, durch Quantifizierung der Aminosäure Phosphothreonin oder durch Dephosphorylierung (Phosphatase-Assay) von ADAM 10 bestimmt wird, oder
- b) Zell- oder Gewebeproben direkt in eine Proteomanalyse eingesetzt werden und der Nachweis von phosphoryliertem ADAM 10 wie unter Punkt a) beschrieben erfolgt.

- 10 Zum generellen Nachweis und zur Quantifizierung von ADAM 10 in Zell- und Gewebeproben bieten sich darüber hinaus spezifische, ADAM 10 erkennende Antikörper und Antikörperderivate an. Unter Antikörperderivaten werden hier rekombinante Einzelketten-Antikörper und auch rekombinante Phagen verstan-
- 15 erkennende Antikörper können daher zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere von *Morbus Alzheimer* und zur Feststellung einer Prädisposition für neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer* verwendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind somit Antikörper oder Antikörperderivate, die ein Proteaseprotein spezifisch binden

20

Folgende transgene nicht-menschliche Tiere sind weitere erfindungsgemäße Gegenstände.

- 25 a) Transgenes nicht-menschliches Tier, das rekombinante Nukleinsäure, codierend für ein Proteaseprotein oder für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier aufweist.
- b) Transgenes nicht-menschliches Tier, aufweisend eine zu einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers codiert, mindestens über einen Abschnitt
- 30 von 10 Basen komplementäre rekombinante Nukleinsäure.

Transgene Tiere können im Rahmen der Erfindung homozygot oder heterozygot in bezug auf das Gen sein, das dem Tier die transgene Eigenschaft verleiht. Außerdem sind von dem Begriff „transgenes Tier“ Menschen nicht umfaßt.

Transgene Tiere werden auf an sich bekannte Weise erzeugt. Hierbei wird bei einer Ausführungsform von Tier a) rekombinante Nukleinsäure verwendet, z.B. in Form eines Vektors, die für ein Proteaseprotein codiert. Bei einer anderen wird rekombinante Nukleinsäure verwendet, z.B. in Form eines Vektors, die für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier codiert.

Bei Tier b) wird eine sogenannte *antisense*-Nukleinsäure verwendet, die über einen Bereich von mindestens 10 Basen (vorzugeweise 15, insbesondere 20 oder 30 Basen) einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers (auch eines Menschen) codiert, komplementär ist, d.h. an die Nukleinsäure binden kann.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der Tiere a) und b) als Tiermodelle für die Suche und die Erprobung von pharmakologischen Wirkstoffen gegen neurodegenerativen Erkrankungen, speziell gegen *Morbus Alzheimer*. Weiterhin können physiologische Veränderungen oder Verhaltenseigenarten der Tiere Ausschluß darüber geben, welche Prozesse oder Entwicklungsstadien eines Organismus durch ADAM 10 beeinflußt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer rekombinanten Nukleinsäure, codierend für ein Proteaseprotein oder für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier zur Erzeugung transgener Zellen und transgener nicht-menschlicher Tiere und zur Gentherapie.

Die Verwendung einer Nukleinsäure, die für die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 des Menschen codiert, ist bevorzugt. Bei der Konstruktion des Vektors für die Gentherapie wird die Nukleinsäure gegebenenfalls über eine Mehrfachschnittstelle (*multiple cloning site*) in den Vektor so eingebaut, daß in einer Zelle,

die mit dem so konstruierten Vektor transfiziert ist, Expression der rekombinanten Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 feststellbar ist. Durch das Einschleusen von Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 oder eines katalytisch aktiven Teils derselben in die Zielzellen im Rahmen der Gentherapie können α -
5 Sekretaseaktivitätsdefekte von Zellen kompensiert werden. Dadurch können die Symptome von *Morbus Alzheimer* und anderer neurodegenerativer Erkrankungen zurückgedrängt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer zu einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers codiert, mindestens über einen Abschnitt von 10 Basen (vorzugweise 15, insbesondere 20 oder 30 Basen) komplementäre rekombinante Nukleinsäure zur Erzeugung von transgenen Zellen und transgenen nichtmenschlichen Tieren und zur Gentherapie.

15 Ebenfalls zur Erfindung gehört also auch die Erzeugung von transgenen Tieren, bei denen eine ADAM 10-Protease, eine dominant negativ wirkende Mutante derselben, oder eine zur ADAM 10-DNA-Sequenz entgegengesetzt komplementäre (revers komplementäre) Nukleinsäure zusätzlich exprimiert bzw. transkribiert wird. Die zu transkribierende Nukleotidsequenz kann dabei unter Kontrolle eines
20 ubiquitär aktiven Promotors wie z.B. dem Cytomegalie-Viruspromotor (CMV-Promotor) stehen. Mit diesem ist eine Expression in allen Geweben möglich. Alternativ kann die zu transkribierende Nukleotidsequenz unter Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors stehen. Von besonderem Interesse sind hier solche Promotoren, die eine gehirnspezifische Expression erlauben, insbesondere solche,
25 die für Neuronen und Gliazellen spezifisch sind. Unter Verwendung des Promotors des Thy1-Glykoproteins der Maus gelang es beispielsweise, das humane Amyloid-Vorläuferprotein in Neuronen von Mäusen zu exprimieren (Moechars et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, Seiten 6483-6492). In Analogie hierzu könnte eine ADAM 10-Protease, deren dominant negative Form oder eine entgegengesetzt
30 komplementäre Form in Neuronen von Mäusen entweder alleine oder zusammen mit Varianten des humanen Amyloid-Vorläuferproteins exprimiert werden. Sol-

che transgenen Tiere können als Modellsysteme zum Testen und Auffinden von Pharmaka und zur Untersuchung der Amyloidprozessierung verwendet werden. Die Überexpression einer proteolytisch aktiven ADAM 10-Protease sollte dabei die Entstehung von Amyloid- β -Peptiden verhindern bzw. zumindest verlangsamen. Die Expression einer dominant negativ wirkenden ADAM 10-Mutante sollte
5 die Aktivität der endogenen ADAM 10-Protease hemmen und damit zu einer vermehrten Entstehung von Amyloid- β -Peptiden beitragen. Eine zweite Strategie zur Ausschaltung der endogenen ADAM 10-Protease stellt die Transkription einer zur ADAM 10-cDNA entgegengesetzt komplementären DNA dar. Mit dieser so-
10 genannten *antisense*-Strategie ist es möglich, die Expression eines endogenen Proteins in Zellkultur zu unterdrücken (siehe z.B. Volonte et al. (1999) FEBS Lett. 445, Seiten 431-438). Das Ausschalten von Genen ist mit einem solchen Ansatz auch in vivo möglich (siehe z.B. Hayashi et al. (1996) Gene Therapie 3, Seiten 878-885).

15

Ein weiter Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel, das eine rekombinante Nukleinsäure enthält, die für ein erfindungsgemäßes Proteaseprotein codiert.

Ein solches rekombinantes Arzneimittel ist z.B. ein Virus oder ein Vektor für die Gentherapie, der Nukleinsäure, die für ein erfindungsgemäßes Proteaseprotein
20 codiert, aufweist.

Als Arzneimittel kann weiterhin ein katalytisch aktiver, löslicher Proteinanteil von ADAM 10 dienen. Dieses Polypeptid wird nach den dem Fachmann bekannten Methoden rekombinant z.B. in Bakterien, Insektenzellen, Hefen oder eukaryontischen Säugerzellen hergestellt und in reiner Form isoliert. Die Applizierung dieses ADAM 10-Polypeptids erfolgt bevorzugt durch Injektion oder durch Resorption.
25

30 Die Erfindung wird durch die nachfolgende Zeichnung näher erläutert.

Es zeigt

Fig. 1 den Expressionsvektor 136.1, der für ein Substratprotein codiert, das ein Fusionsprotein aus SEAPs und APP₁₁₉ darstellt.

5

Fig. 2 den Expressionsvektor 137.11, der außer für das vorgenannte Fusionsprotein für ein Proteaseprotein codiert, welches aus einer markierten Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 besteht.

10 Fig. 3 die proteolytische Spaltung von Peptiden, die die α -Sekretaseschnittstelle von APP aus dem Rind umfassen, durch Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10.

15 Fig. 4 die Expression und Deglycosilierung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10.

20 Fig. 5 die Sekretion von APPs α von unveränderten HEK-Zellen (HEK 293, kurz HEK steht für *human embryonic kidney*) und von HEK-Zellen, die die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 exprimieren (HEK-ADAM 10-Zellen).

Fig. 6 den Einfluß des Metalloprotease ADAM 10 auf die Entstehung der Proteolyseprodukte APPs α und p10.

25 Fig. 7 den inhibierenden Effekt der dominant negativen Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 (DN).

30 Fig. 1 zeigt den Vektor 136.1, der auf einem pcDNA3-Vektor (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande) basiert und in den eine Nukleinsäure einkloniert wurde, die für ein Protein gemäß SEQ ID-No.:1 codiert. Zur Konstruktion der Nukleinsäure wurde der Bereich, der die ersten 506 aminoterminalen Aminosäuren von SEAP codiert, durch PCR amplifiziert (Produkt: SEAPs-DNA). Als Matrize wur-

de der Vektor pSEAP (Tropix Corp., Belford, Massachusetts, USA) benutzt. Durch PCR wurde eine BsrGI-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Die codierende Region für die letzten 119 carboxyterminalen Aminosäuren des menschlichen Amyloidvorläuferproteins wurden durch PCR auf der korrespondierenden cDNA amplifiziert (Produkt: APP₁₁₉-DNA). Durch PCR wurde eine BsrGI-Schnittstelle am 5'-Ende der cDNA eingeführt. Die BsrGI-Schnittstellen der SEAPs-DNA und APP₁₁₉-DNA wurden für die Konstruktion einer Nukleinsäure eingesetzt, die für das SEAPs/APP₁₁₉-Fusionsprotein gemäß SEQ ID-No.:1 codiert, eingesetzt.

10 Fig. 2 zeigt den Vektor 137.11, der Sequenzbereiche enthält, die für das vorgenannte Fusionsprotein und eine mit einem Marker (Influenza Hämagglutinin (HA) Epitop tag) markierte Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10-Variante codieren. 137.11 basiert auf dem Vektor pcDNA3 der Firma Invitrogen.

15 Fig. 3 zeigt die proteolytische Spaltung von Peptiden, die die Stelle der α -Sekretasespaltung von APP durch ADAM 10 umspannen.

(A) Ordinate: relative Absorption [220 nm], Absisse: Zeit [min]. Peptidsubstrate wurden in Spaltungspuffer in Abwesenheit (linker Graph) oder in Anwesenheit von ADAM 10 (rechter Graph) 6 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend der HPLC-Analyse unterzogen. Die Sterne kennzeichnen die Peptidsubstrate und die Zahlen, die generierten Produkte: 1 : EVHHQK-OH; 2 : LVFFAEDVGSNK-NH₂; 3 : LVFFGEDVGSNK-NH₂.

20 (B) CD-Spektren von APP-Peptiden. Ordinate: Elliptizität [θ] (deg x 10⁻³); Absisse: Wellenlänge [nm]. Die Peptide wurden in 20 mM Tris/HCl pH 8,3, 250 mM NaCl bei einer Endkonzentration von 0,5 mM gelöst. Die Messungen wurden in Gegenwart von 0,5 % Natriumdodecylsulfat (SDS) ausgeführt.

Fig. 4 zeigt die Expression und Deglycosilierung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10

30 (A) nach Transfektion von HEK-Zellen und HEK-APP₆₉₅-Zellen mit ADAM 10-cDNA wurden Zellysate mit monoklonalen Anti-HA-Antikörper immunoprecipitiert, der Deglycosilierung mit PNGase F (Spur 3) unterworfen oder

- direkt durch ein 4-12 % NuPAGE-Gelsystem und Western Blot analysiert. HEK-APP₆₉₅-Zellen sind HEK-Zellen, die ein humanes 695 Aminosäuren großes Amyloidvorläuferprotein (GenBank/EBML-Datenbank-Zugangsnummer: Y00264) exprimieren. Immunoblots wurden mit dem ECL-
- 5 Detektionssystem (Pharmacia&Upjohn GmbH, Erlangen) durchgeführt.
- (B) HEK und HEK-ADAM-10-Zellen wurden mit 0,3 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, Illinois, USA) in PBS 30 min bei 4°C inkubiert. Nach Immunopräzipitation mit dem monoklonalen Anti-HA-Antikörper (16B12) und Elution des Immunkomplexes wurden 4/5 des Eluats mit Strep-
- 10 tavidin (a), inkubiert, während das verbliebene Fünftel direkt einer 10 %-igen SDS-PAGE unterworfen wurde (b) und anschließend auf PVDF-Membranen geblottet wurde. Die Detektion wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Fig. 5 zeigt die Sekretion von APP α von HEK- und HEK-ADAM-10-Zellen.

- 15 (A) Die Zellen wurden in Gegenwart der bezeichneten Verbindung inkubiert. Nach 4 Stunden wurde das Medium gesammelt, die Proteine präzipitiert und einer Immunoblotanalyse mit dem monoklonalen Antikörper 6E10, gefolgt von einem sekundären [³⁵S]-markierten Anti-Maus-IgG-Antikörper, unterzogen.
- 20 (B) Quantitative Analyse des sekretierten APP α . Die APP α entsprechenden radioaktiven Banden wurden mit Hilfe eines Bio-Imaging Analyzer BAS-1800 quantifiziert. Die Meßwerte wurden wie in dem Beispiel beschrieben, auf verschiedene Proteinmengen normiert. Die Ergebnisse wurden als Prozentwerte von sekretiertem APP α in nicht-rekombinanten Vergleichs-HEK-
- 25 Zellen ausgedrückt und die Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten angegeben. Ordinate: Sekretion von APP α [Prozentwert der Wirkung in HEK-Zellen]. Absisse: Probennummer, dieselbe Numerierung wie in (A).

- 30 Fig. 6 zeigt den Einfluß der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 auf die Entstehung der Proteolyseprodukte APP α und p10.

- (A) HEK und HEK-ADAM-10-Zellen wurden mit 200 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{35}S] L-Methionin und Cystein fünf Stunden metabolisch markiert. Die Kulturmedien wurden mit dem polyklonalen Antikörper 1736 immunoprecipitiert und einer 10 %-igen SDS-PAGE unterzogen. Die Analyse wurde mit dem Bio-Imaging Analyzer BAS-1800 durchgeführt. APP₇₅₁ α bezeichnet das Proteolyseprodukt, das durch α -Sekretase-Einwirkung auf eine APP-Variante, welche 751 Aminosäuren umfaßt, entsteht.
- (B) Die Zellysate wurden mit dem Antikörper C 7 immunoprecipitiert. Die Proben wurden mit Hilfe eines 10 – 20 %-igen Tris-Tricine Gel (Novex) getrennt und wie oben beschrieben analysiert.
- (C) Quantitative Analyse von intaktem APP, das die ganze Länge aufweist (Holo-APP), und p10. Die entsprechenden radioaktiven Banden wurden wie in Fig. 5 quantifiziert. Die Werte von p10 wurden auf die Holo-APP-Spiegel normiert. Die Ergebnisse vier unabhängiger Experimente wurden mit den entsprechenden Standardabweichungen angegeben. Die statistische Signifikanz zwischen Vergleichszellen und HEK-ADAM-10-Zellen wurde mit Hilfe des ungepaarten Student's *t*-Test bestimmt (*, $P < 0,005$).

Fig. 7 zeigt den inhibierenden Effekt der dominant negativen Mutante DN der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10.

- (A) Endogene Expression der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 in HEK-Zellen. ADAM 10 mRNA von MDBK und HEK-Zellen wurde mit einem Oligonucleotid, das spezifisch für die bovine und die humane ADAM 10 mRNA ist, revers transkribiert und anschließend amplifiziert, was Fragmente mit 541 Basenpaaren ergab. Als Vergleich wurden HEK-Zellen, die vor dem Reverse-Transkriptase-Schritt mit RNase A behandelt worden waren, eingesetzt. Als Standard wurde der DNA-Molekulargewichtsmarker VI (St, siehe Abbildung) von Boehringer Mannheim eingesetzt. Die Fragmente zwischen 1230 und 154 Basenpaaren sind gezeigt.
- (B) HEK und HEK/DN-Zellen wurden in Abwesenheit und Anwesenheit von 1 μM PMA inkubiert. HEK/DN-Zellen sind Zellen, die die dominant negativen Mutante DN der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 exprimieren.

Nach vier Stunden wurde das Medium gesammelt, die Proteine präzipitiert und einer Immunoblotanalyse, wie in Fig. 5 beschrieben, unterzogen.

- (C) Quantitative Analyse des sekretierten APP α . Die radioaktiven Banden gehören zu APP α und wurden quantifiziert, wie in Fig. 5 beschrieben. Die Ergebnisse sind als Prozentwerte des sekretierten APP α in Vergleichs-HEK-Zellen ausgedrückt und als Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten angegeben. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichungen. Die statistische Signifikanz zwischen Kontrollzellen und HEK/DN-Zellen, mit und ohne PMA-Behandlung, wurde durch den ungepaarten Student's *t*-Test bestimmt (*, $P < 0,005$; **, $P < 0,001$).
 Ordinate: Sekretion von APP α [Prozentwert der Wirkung in HEK-Zellen].

- Die Erfindung wird näher durch die nachfolgenden Beispiele beschrieben.

Materialien

- Die Peptide wurden mit dem Festphasenverfahren unter Verwendung von Fmoc-Chemie auf dem 9050 + Millipor Peptidsynthesizer synthetisiert. BB-3103 wurde von der British Biotech zur Verfügung gestellt. Die Antikörper und ihre Quellen waren: Anti-HA-Epitop-IgG (monoklonaler Antikörper Klon 16B12 aus der Maus, BAbCO; polyklonaler Antikörper Y-11 aus dem Kaninchen, Santa Cruz Biotechnology), Anti-Kaninchen-Ig-Meerrettichperoxidase-gekoppelter Antikörper und [^{35}S] anti-Maus-IgG-Antikörper von Amersham Pharmacia Biotech. Antikörper gegen APP: monoklonaler Antikörper IgG 6E10 aus der Maus von Senteck; polyklonaler Antikörper 1736 aus dem Kaninchen und C7 wurden von Dennis J. Selkoe zur Verfügung gestellt. Weitere Chemikalien sind in Tabelle 1 aufgeführt. Sofern nicht anders gekennzeichnet sind sämtliche Lösungen wässrig.

- Tabelle 1:

CHAPS:	3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propansulfonat
EPPS:	N-[2-Hydroxyethyl]Piperazin-N'-[3-Propansulfonsäure]

PBS:	8g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ ; 0,24 g/l KH ₂ PO ₄ ; pH 7,0-7,5
PMA:	Phorbol-12-myristat-13-acetat
TBS	8g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 3g/l Tris/HCl; pH 7,0-7,5
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoracetat
Tris	Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan

Beispiel 1

Reinigung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10:

Die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 wurde aus Rindernierenplasma-
 5 menbranen nach dem Verfahren von Howard und Glynn (Meth. Enzymology
 (1995) 248, Seiten 388 bis 395) bis zur Homogenität aufgereinigt. Nach dem
 DEAE-Sephacel-Schritt wurden aktive Fraktionen direkt auf eine Hydroxylapatit-
 säule aufgegeben, die mit 20mM Tris/HCl pH 7, 0,1 mM K₂HPO₄ und 0,3 %
 CHAPS äquilibriert worden war. Aktives Enzym wurde mit 51 mM Kaliumphos-
 10 phat pH 7,0 eluiert. Eine Analyse Enzymaktivität enthaltener Proteinfractionen
 mit SDS-PAGE ergab ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 62.000.
 Aminoterminal Sequenzanalyse ergab eine Aminosäuresequenz von
 TTVXEKNTXQLYIQTDXXFF, die identisch mit der von Rinder-MADM ist
 (Howard et al. (1996) (Biochem. J. 317, Seiten 45 bis 50) ebenfalls bekannt als
 15 ADAM 10 (Wolfswerk et al. (1995) J. Cell Biol. 131, Seiten 275 bis 278).

Beispiel 2

Proteasetestverfahren zur Bestimmung der Substratspezifität:

Peptide einer Endkonzentration von 0,3 mM wurden mit 2 µg gereinigten Enzym
 20 in 50 µl 50 mM EPPS pH 8,3, 250 mM NaCl bei 37°C 30 Minuten oder 6 Stunden
 inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 2 µl TFA gestoppt. Meßproben wurden mit
 Hilfe von HPLC auf einer Vydac (The Separation Group, Hesperia, Calif. USA)
 RP 18 Säule (5 µm, 250 x 4,6 mm) analysiert. Die Peptide wurden mit einem Puf-
 fersystem von 0,1 % TFA in Wasser (Puffer A) und 0,1 % TFA, 9,9 % Wasser, 90
 25 % Acetonitril (Puffer B) aufgetrennt, wobei der folgende Gradient angelegt wur-
 de: 0 % B, 5 Min.; 0 bis 70 % B innerhalb 45 Min. Das Molekulargewicht der

Proteolyseprodukte wurde mit ESI-Massenspektrometrie bestimmt. Für die Berechnung der prozentualen Spaltung wurde die Peakfläche, die ein Peptid ergab, das ohne Enzym inkubiert und ansonsten identisch behandelt wurde, als Referenz für 100 % herangezogen.

5

Beispiel 3

Circulardichroismusspektroskopie:

CD-Messungen wurden auf einem Jasco J 720 Spektropolarimeter bei 4°C durchgeführt. Die Schichtdicke der Quarzmeßzelle betrug 0,1 mm. Die Messungen wurden bei einer Peptidkonzentration von 0,5 mM in 20 mM Tris/HCl bei pH 8,3, 250 mM NaCl in Anwesenheit von 0,5 % (w/v) SDS durchgeführt. Als Ergebnis wird die Elliptizität $[\theta]$ (deg x 10⁻³) aufgeführt.

Beispiel 4

15 Klonierung und funktionelle Expression der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10:

PCR-Primer, die auf die Nukleotidsequenz mit der GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer Z21961 passen, wurden benutzt, um die cDNA der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind aus einer Rindernieren-cDNA-Bibliothek zu amplifizieren. Die cDNA von ADAM 10 wurde ohne das Original-Stop-Codon amplifiziert. Statt dessen wurde eine KpnI-Schnittstelle eingeführt und für die Fusion der ADAM 10-cDNA mit einer synthetischen DNA-Kassette, die für das Influenza-Hämagglutinin (HA)-Epitop-tag (YPYDVPDYA) codiert, benutzt. Der Vergleich der klonierten Nucleotidsequenz von Rinder-ADAM 10 wurde mit der publizierten Original-Sequenz [Howard et al. (1996) (Biochem. J. 317, Seiten 45 bis 50, GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer Z21961] verglichen und zeigte die folgenden Austausche: C700T, C2122T und C2251T (die Nukleotidkoordinaten entsprechen der Sequenz mit der Zugangsnummer Z21961). Die Austausche verändern nicht die Aminosäurenabfolge.

30

Zur Expression der carboxyterminal HA-markierten Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 wurde der Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen BV, Gronningen,

Niederlande) benutzt. Die stabile Transvektion von HEK-Zellen wurde nach der Calciumphosphat-Präzipitationstechnik durchgeführt. Zur Selektion transfizierter Zellen wurde 1 mg/ml Geneticin benutzt. Die Überexpression von ADAM 10 beschleunigte das Wachstum von transfizierten HEK-Zellen nicht.

5

Um die dominante negative Mutante der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (mit DN bezeichnet, siehe Fig. 7, B) herzustellen, wurde eine Aminosäuresubstitution Alanin für Glutamat bei Position 384 (E384A) mittels PCR-Mutagenese durchgeführt (Die Nummerierung der Aminosäuren in der Angabe
10 E384A bezieht sich auf die publizierte Sequenz der Disintegrin Metalloprotease ADAM 10 des Rindes gemäß Howard et al. (1996) Biochem. J. 317, Seiten 45 bis 50, GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer Z21961). Die amplifizierte cDNA der ADAM-10-Mutante wurde in pcDNA3 einkloniert und eine DNA-Kassette, die für ein FLAG-Epitop-tag (DYKDDDDK) am 3'-Ende eingefügt. Die
15 korrekte Sequenz aller PCR-Produkte wurde mit Didesoxynucleotid-Sequenzierung überprüft. HEK-Zellen wurden, wie vorstehend beschrieben, transfiziert und selektiert. Um die Expression der ADAM-10-Mutante zu überprüfen, wurde das Protein mit Western Blot Analyse unter Verwendung eines M2 Anti-FLAG-Antikörpers (Kodak) und dem ECL-Detektionssystems (Amersham Pharmacia Biotech) nachgewiesen.
20

Beispiel 5

Reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion(PCR):

Gesamt-RNA von MDBK-Zellen (Madin Darby bovine kidney) und HEK-Zellen
25 wurde unter Verwendung des RNeasy Kits (Qiagen GmbH, Hilden) hergestellt. Zur reversen Transkription der menschlichen und der Rinder-ADAM-10 mRNA wurde ein genau passendes Oligonucleotid für das 3'-Ende der mRNAs benutzt (5'-TGCACCGCATGAAAACATC-3'). Die PCR wurde durch Zugabe eines Vorwärtsprimers 5'-GAACAAGGTGAAGAATGTG-3' mit einer Sequenz
30 durchgeführt, die in der menschlichen und in der Rinder-ADAM-10 cDNA identisch ist. Um die Herkunft der amplifizierten Fragmente als revers transkribierte

mRNA sicherzustellen, wurde RNA vor Zugabe der Reversen Transkriptase in einem Kontrollversuch durch RNase A abgebaut.

Beispiel 6

5 Expression und Deglycosilierung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10:

Stabil ADAM 10 exprimierende HEK-Zellen und Vergleichszellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sublimiert mit 10 % fötalem Kälberserum, Penicillin (100 Einheiten pro ml), Streptomycin (100 µmg/ml) und 2 mM Glutamin auf Kulturschalen eines Durchmessers von 10 cm bis zur Konflu-
10 enz hochgezogen. Die Zellen wurden in 20 Min. auf Eis 1 ml Lysispuffer lysiert (20 mM Imidazol pH 6,8, 0,2 % Triton X-100, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 300 mM Saccharose, 1 mg/ml BSA) in Anwesenheit eines Inhibitors (completeTM Mini, Boehringer Mannheim). Die geklärten Extrakte wurden mit 6,6 µg/ml monoklonalem anti-HA-Antikörper (16B12) und Protein A-Sepharose bei
15 4°C über Nacht inkubiert. Für Deglycosilierungsexperimente wurden die Immunkomplexe in 100 µl 1 % SDS und 2 % β-Mercaptoethanol 10 min gekocht. Nach Zentrifugation wurde das Eluat mit 2.500 Einheiten PNGase F (New England Biolabs, Inc., Massachusetts, USA) in 50 mM Natriumphosphat PH 7,5, 1,5 % Nonidet-P40 und 0,25 % SDS 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden
20 wie bei Wessel und Flügge (1984) (Anal. Biochem. 138, Seiten 141 bis 143) präzipitiert, mit Hilfe eines 4 bis 12 %-igen NuPAGE-Gels (Nowex) getrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Membranen wurden mit polyklonalem anti-HA-Antikörper (Y-11) bei einer Verdünnung von 1:1.000 inkubiert, gefolgt von einem sekundären anti-Kaninchen-Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper. Die
25 Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems.

Beispiel 7

Zelloberflächenbiotinylierungen:

Die Zellen wurden bis zur 90 %-igen Konfluenz herangezogen und mit PBS ent-
30 haltend 0,3 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, Illinois, USA) 30 Min. bei 4 °C inkubiert. Überschüssiges Biotinylierungsreagenz wurde durch mehrmaliges Waschen mit TBS entfernt. Die Zellysate wurden mit monoklonalem

anti-HA-Antikörper wie vorstehend beschrieben immunopräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden von gewaschenen Protein-A- Beads mit 200 µl 100 mM Glycin pH 2,5 und 20 µM kompetierendes HA-Peptid (entsprechend den Aminosäuren 98 bis 108 des Influenza Hämagglutinin-Proteins) eluiert. Die Überstände wurden gesammelt und mit 5 µl 3 M Tris pH 8,9 neutralisiert und mit Streptavidin-Agarose-Beads (Pierce, Rockford, Illinois, USA) zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden mit Hilfe von 10 % SDS PAGE analysiert und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Blots wurden wie vorstehend beschrieben analysiert.

10 Beispiel 8

Immunoblotanalyse:

8·10⁵ HEK und HEK-ADAM10-Zellen (HEK-Zellen, die ADAM 10 stabil exprimieren, Verfahren wie oben) wurden auf 5 cm Zellkulturschalen, die mit Poly-L-Lysin behandelt worden waren, ausgesät und fast bis zu Konfluenz hochgezogen. Das Medium wurde verworfen und die Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit der aufgeführten Verbindung 4 Stunden in Serum-freien DMEM mit 10 µg/ml Fettsäure-freiem BSA inkubiert. Das Medium wurde gesammelt und die Proteine mit 10 % (v/v) TCA präzipitiert. Die Proben wurden bei 14.000 UpM zentrifugiert und die Pellets zweimal mit 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen. Die Proteine wurden mit 7,5 % SDS-PAGE getrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Membranen wurden mit monoklonalem Antikörper 6E10, der die aminoterminal Sequenz von Aβ erkennt, bei einer Verdünnung von 1:2.000 gefolgt von einem sekundären [³⁵S]-markierten anti-Maus IgG-Antikörper inkubiert. Die radioaktiven Banden, die APPsα entsprachen, wurden mit Hilfe des Bio-Imaging-Analysers-BAS-1800 (Fuji) quantifiziert. Der Proteingehalt jeder Zellkulturplatte wurde nach Dialyse mit dem Mikro-BCA Proteinassay (Pierce, Rockford, Illinois, USA) bestimmt und die Meßwerte der radioaktiven Banden auf die Proteinmenge normiert.

30 Beispiel 9

Metabolische Markierung und Immunopräzipitation:

1·10⁶ HEK-Zellen und HEK-ADAM10-Zellen wurden wie oben beschrieben auf 10 cm Zellkulturplatten hochgezogen. Die fast konfluenten Zellkulturen wurden in Serum-freien und Cystein- und Methionin-freiem DMEM 1 Stunde inkubiert, und dann in demselben Medium mit 0,2 mCi/ml Tran[³⁵S]-labelTM (ICN) 5 Stunden markiert. Die Immunopräzipitationen wurden ausgeführt, wie in Haass et al. (1991) (J. Neurosci. 11, Seiten 3.783 bis 3.793) und Haass et al. (1992) (Nature 359, Seiten 322 bis 335) beschrieben. APPS α wurde mit dem α -Sekretase-spezifischen polyklonalen Antikörper 1736 und das 10 kDa-Fragment (p10) mit dem polyklonalen Antikörper C7, der den carboxyterminalen Teil von APP erkennt, immunpräzipitiert. Die Radioaktivität wurde mit Hilfe des Bio-Imaging-Analysers BAS-1800 (Fuji) detektiert.

Beispiel 10

Spezifität der gereinigten Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 für verschiedene Peptidsubstrate.

Als Peptidsubstrat, das die α -Sekretase-Schnittstelle umfaßt, wurde die Octapeptid-Aminosäuresequenz 11 bis 28 von A β gewählt (die Numerierung bezieht sich auf den Aminoterminus des β -Amyloid-Peptids (Esch et al. (1990) Science 248, Seiten 1122 bis 1124 und Haass et al. (1992) Nature 359, Seiten 322 bis 325). Seine carboxyterminale Aminosäure entspricht der ersten extrazellulären Aminosäure von APP. Nach 30 min Inkubation von A β (11-28) mit ADAM 10 zeigte die HPLC-Analyse eine Spaltungsausbeute von 28 % bezogen auf das Startpeptid und unter Bildung von zwei Proteolyseprodukten (siehe Tabelle 2).

Die ESI-massenspektrometrische Analyse identifizierte die Proteolyseprodukte als das aminoterminal Hexapeptid ([M+H]⁺-Ion mit m/z von 777,5) und als das carboxyterminale Dodecapeptidamid ([M+H]⁺-Ion mit m/z von 2.082,8) des ursprünglichen Octadecapeptidamids. Folglich spaltet die Disintegrin-Metalloprotease ADAM-10 proteolytisch zwischen Lys 16 und Leu 17 (Nummerierung beginnend mit dem Aminoterminus von A β), wie es für ein Enzym mit α -Sekretaseaktivität zu erwarten ist. Nach 6-stündiger Inkubation waren 69 % des

A β (11-28) vorwiegend an dieser Seite gespalten, seltener erfolgte eine Spaltung hinter Leu 17 und Val 18 (FIG. 3 A; Tabelle 2).

Anschließend wurde überprüft, ob die Spaltungshäufigkeit wie für die Spaltung von APP durch die α -Sekretase beschrieben worden ist (siehe Sisodia (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89, Seiten 6075 bis 6079) von der Konformation des Substrats abhängt. Zu diesem Zweck wurde Alanin 21 in A β (11-28) durch Lysin ersetzt. Diese Position entspricht einer natürlich vorkommenden Ala \rightarrow Gly-Mutation bei Position 692 von APP₇₇₀ (Hendricks et al. (1992) Nat. Genet. 1, Seiten 218 bis 221), die in Patienten mit zerebraler Hämorrhagie in Folge von Amyloidangiopathie identifiziert wurde (Haass et al (1994) J. Biol. Chem. 269, Seiten 17741 bis 17748; Capell et al. (1996) Amyloid 3, Seiten 150 bis 155).

Cirkulardichroismus-Messungen (CD) des Octadecapeptidamids A β (11-28) in 0,5 % SDS zeigten ein Spektrum, das charakteristisch für die α -helicale Konformation ist, während eine Zufallsknäuel-Konformation im Falle des Peptids mit dem Austausch Ala \rightarrow Gly in Position 21 von A β (11-28) (siehe FIG. 3 B) beobachtet wurde. Das letzte Peptid wurde durch die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 weniger effektiv als das Wildtyp-Peptid gespalten: Nach 30 Min. wurde nur 14 % zwischen Lys 16 und Leu 17 gespalten, verglichen mit 28 % im Falle von A β (11-28) (siehe Tabelle 2). Ein Vergleichsbeispiel zeigt, daß ADAM 10 nicht die Peptidsubstrate spaltet, die eine Schnittstelle für das sog. *Ectodomain Shedding*, das Abwerfen einer Außendomäne, des Angiotensin umwandelnden Enzyms (ACE) (Ehlers et al (1996) Biochemistry 35, Seiten 9549 bis 9559) oder des Interleukin 6-Rezeptors (Müllberg et al. (1994) J. Immunol. 152, Seiten 4958 bis 4968), besitzen. Allerdings spaltet ADAM-10 offensichtlich ein von pro-TNF- α abgeleitetes Peptidsubstrat, wie neulich berichtet wurde (Lunn et al. (1997) FEBS Lett. 400, Seiten 333 bis 335; Rosendahl et al (1997) J. Biol. Chem. 272, Seiten 24588 bis 24593). Einige Metalloproteinase-Inhibitoren wurden auf ihre Fähigkeit, die proteolytische Spaltung von A β (11-28) durch gereinigtes ADAM 10 zu inhibieren, getestet. Der auf einer Hydroxamsäure basierende Inhibitor BB-3103 (Middelhoven et al. (1997) FEBS Lett. 414, Seiten 14 – 18) inhibierte bei einer Kon-

zentration von 100 μ M vollständig die proteolytische Spaltungsaktivität. Die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 wurde auch durch 1 mM DTT vollständig inhibiert, was darauf schließen läßt, daß eine Thiol-Gruppe oder Disulfidbindungen wichtig für die α -Sekretaseaktivität sind. Ferner inhibierte ADAM-10 1 mM
5 1,10-Phenanthrolin.

Beispiel 11

Prozessierung und Lokalisation der Metalloprotease ADAM 10 in HEK-Zellen

Um die Wirkung der Metalloprotease ADAM 10 auf die proteolytische Spaltung
10 von APP in einem Zellsystem zu untersuchen, wurden HEK 293-Zellen eingesetzt. Die cDNA der Metalloprotease ADAM 10 wurde aus einer Rindernieren cDNA-Bibliothek kloniert, an ihrem 3'- mit einer DNA-Sequenz, die für das HA-Antigen kodiert, versehen und in den Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande) kloniert. Nach der Transfektion von HEK-Zellen und
15 HEK-Zellen, die APP₆₉₅ stabil exprimieren [HEK APP₆₉₅, Haass et al. (1992), Nature 359, Seiten 322 – 325], mit Nukleinsäure, kodierend für die Metalloprotease ADAM 10, wurden Klone auf die Expression und Prozessierung der Metalloprotease hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden Zellysate mit dem monoklonalen anti-HA-Antikörper (16B12) präzipitiert mit SDS-PAGE analysiert und
20 einem Western Blot unterzogen. Immuno-Anfärbungen mit einem anti-HA-polyklonalen Antikörper zeigten 2 immunoreaktive Spezies einer apparenten Größe von 90 kDa und 64 kDa (Fig. 4 A, Spuren 2 – 5). Die 64 kDa-Variante wird aus der 90 kDa-Variante durch Abspaltung der Pro-Domäne (194 Aminosäuren) gebildet. Wahrscheinlich geschieht dies durch eine Furin-ähnliche Pro-
25 Proteinkonvertase, die die Disintegrin-Metalloproteasen bei dem Sequenzmotiv RXKR in einem späten Golgi-Kompartiment spaltet (Lum et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, Seiten 26236 – 26247). Die berechnete Molekularmasse der Metalloprotease ADAM 10 nach der proteolytischen Abspaltung der Prodomäne ist 61 kDa. Um zu untersuchen, ob die Differenz zwischen apparenten und berechneten
30 Molekulargewicht auf die Glycosilierung an den putativen N-Glycosilierungsstellen der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 zurückzuführen ist (Howard et al. 1996) Biochem. J. 317, Seiten 45 – 50), wurden die Glyco-

proteine des Zellklons mit dem höchsten Expressionsspiegel an Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 (HEK-ADAM 10) mit N-Glycosidase F behandelt. Diese Behandlung führte zu einer Reduktion der Molekularmasse auf die erwarteten Werte von etwa 86 kDa für das Vorläuferprotein und von 61 kDa für die
5 prozessierte Variante der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10, der die Prodomäne fehlt (Fig. 4 A, Spur 3).

Die Lokalisation der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 in transfizierten HEK-Zellen wurde durch Zelloberflächen-Biotinylierung und konfokale Mikro-
10 skopie untersucht. Zur Biotinylierung wurden die Zellen auf 4°C gekühlt und 30 Minuten mit Sulfo-NHS-LC-Biotin, einem membranimpermeablen Biotinylierungsreagenz, inkubiert. Die Immunopräzipitation wurde unter Verwendung eines monoklonalen Anti-HA-Antikörpers durchgeführt. 4/5 der gesammelten Immunopräzipitate wurden mit immobilisiertem Streptavidin inkubiert, um die Protease-
15 moleküle an der Plasmamembran zu isolieren. Fig. 4 B zeigt die Anwesenheit von sowohl der prozessierten etwa 64 kDa großen Variante der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 als auch ihres 90 kDa großen Vorläufers auf der Zelloberfläche (Spur A). 1/5 des Immunopräzipitates, das nicht mit Streptavidin inkubiert worden war, zeigte vornehmlich die nicht-prozessierte 90 kDa große
20 Variante, und eine nur schwache Bande wies auf die proteolytisch aktivierte Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 hin (Spur B). Diese Ergebnisse zeigen, daß die proteolytisch aktivierte Form der Metalloprotease ADAM 10 vornehmlich an der Zelloberfläche lokalisiert ist, wo sie in der Lage ist APP proteolytisch zu spalten. Der überwiegende Teil der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 liegt
25 intrazellulär als Proenzym vor. Eine Analyse der Lokalisation der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 mit Hilfe von konfokaler Immunofluoreszenzmikroskopie an permeabilisierten HEK-ADAM 10 Zellen zeigte, daß das Anfärbemuster größtenteils mit dem des Golgi-assoziierten Markers 58k überlappt (Ergebnisse nicht gezeigt).

30

Beispiel 12

Wirkung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 auf die α -Sekretase Spaltung von APP in HEK-Zellen.

Die α -Sekretaseaktivität in HEK-ADAM 10 Zellen wurde mit der Aktivität, die in untransfizierten HEK-Zellen gefunden wurde, verglichen. Die Freisetzung von APPs in das Medium wurde mit zwei bindungsortsspezifischen Antikörpern (1736
5 und 6E10) bestimmt. Beide Antikörper erkennen die aminoterminal Sequenz von A β und detektieren daher nur APPs α aber nicht APPs β . Immunoblotexperimente und Immunopräzipitation nach metabolischer [35 S]-Markierung wurden durchgeführt, um die α -Sekretaseaktivität zu quantifizieren (Fig. 5 und Fig. 6). Die quantitative Analyse der Immunoblotexperimente mit dem monoklonalen Antikörper
10 6E10 zeigte, daß HEK-Zellen, die stabil einen hohen Spiegel der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 exprimieren, ungefähr die vierfache Menge APPs α ins Medium abgeben als die untransfizierten HEK-Zellen (Fig. 5, Spuren 1-4). Eine erhöhte α -Sekretaseaktivität wurde auch in einem HEK-APP₆₉₅-Zellklon, der stabil die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 exprimiert, festgestellt. Der relative Anstieg von APPs₇₅₁ α , welches von endogenem APP abstammt und von APPs₆₉₅ α war nur zweifach (Fig. 5A, Spuren 7 und 8) infolge des geringeren Ex-
15 pressionsspiegels der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 (Fig. 4, Spur 5) und infolge des höheren Substrat-Enzymverhältnisses.

20 Neulich wurde gezeigt, daß Zink-Metalloproteaseinhibitoren auf der Basis von Hydroxamsäure das *Ectodomain Shedding* verschiedener Membranproteine einschließlich der α -Sekretase-Spaltung von APP unterdrücken. Ein Effekt auf die Freisetzung von APPs β wurde nicht gefunden (Parvathy et al. (1998) Biochemis-
25 try 37, Seiten 1680-1685). Deswegen wurde der Effekt des Hydroxamsäureinhibitors BB-3103 auf HEK-Zellen und auf HEK-Zellen, die die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 überexprimieren, untersucht. BB-3103 verminderte die Freisetzung von APPs α in HEK-Zellen um etwa 40 % (Fig. 5, Spuren 1-3) und in HEK-ADAM 10-Zellen um etwa 70 % (Fig. 5, Spuren 4-6). Die Stimulati-
30 on der Proteinkinase C durch Phorbol ester verstärkt deutlich die Freisetzung von APPs α und inhibiert die Sekretion von A β . Um die Wirkung der Proteinkinase C

auf die Stimulierung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10-Aktivität zu untersuchen, wurden HEK- und HEK-ADAM 10-Zellen mit 1 μ m PMA behandelt. Immunoblotexperimente zeigten, daß PMA die APP α -Freisetzung von HEK-Zellen etwa um das 6-fache erhöht (Fig. 5, Spuren 1 und 2). Die verstärkte α -
5 Sekretaseaktivität von HEK-ADAM 10-Zellen wurde um den Faktor 2,5 vergrößert (Fig. 5, Spuren 4 und 5).

ADAM 10 besitzt in Aminosäureposition 719 ein Threonin, welches als Substrat für eine Proteinkinase C-abhängige Phosphorylierung dienen kann. Eine Verstärkung der α -Sekretaseaktivität von ADAM 10 durch den Proteinkinase C-
10 Aktivator PMA erfolgt offensichtlich über diesen Mechanismus.

Ähnliche Ergebnisse wurden in Immunopräzipitationsexperimenten mit dem polyklonalen Antikörper 1736 erhalten. Die Expression der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 in HEK-Zellen verstärkte signifikant die Sekretion von APP α in das Medium (Fig. 6A). Um zu bestimmen, ob die Expression der
15 Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 auch den Spiegel von p10 erhöht, wurden Zellysate von HEK- und HEK-ADAM 10-Zellen nach metabolischer Markierung mit dem polyklonalen Antikörper C7, der den carboxyterminalen Teil von APP erkennt, immunopräzipitiert. Wie in Fig. 6B und 6C gezeigt, wird die Expression von Holo-APP (APP der vollen Länge) nicht verändert, während das Signal von p10 in HEK-ADAM 10-Zellen signifikant stärker ist als in den Vergleichszellen. Dies zeigt, daß die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 α -Sekretaseaktivität
20 besitzt.

25

Beispiel 13

Wirkung der dominant negativen Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10-Mutante auf die α -Sekretaseaktivität:

30 Um festzustellen, ob das menschliche Homologe der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 in HEK-Zellen exprimiert wird und daher für die endogene α -

Sekretaseaktivität verantwortlich ist, wurden Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktionsanalysen unter Verwendung von Gesamt-RNA aus diesen Zellen und Oligonucleotiden, die spezifisch für ADAM 10 sind, durchgeführt. Wie in Fig. 7A gezeigt, exprimieren HEK-Zellen detektierbare Mengen an mRNA, die für die humane Variante der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 codiert, die 97 % Identität auf Aminosäureebene mit der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind zeigt. In einem Vergleichsexperiment wurde die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10-mRNA in Gesamt-RNA von MDBK-Zellen nachgewiesen, von denen bekannt ist, daß sie die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 exprimieren (Howard et al. (1996) Biochem. J. 317, Seiten 45-50).

Um die endogene α -Sekretaseaktivität in HEK-Zellen zu inhibieren, wurde die Punktmutation E384A in die Zink-Bindungsstelle der Rinder-Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 eingeführt. Eine Mutante des KUZ-Proteins mit einer Mutation an derselben Stelle verhielt sich dominant negativ in *Drosophila melanogaster* (Pan und Rubin (1997) Cell 90, Seiten 271-280). HEK-Zellen, die die Mutante ADAM 10 E384A (HEK/DN) exprimieren, zeigten eine deutlich verminderte Sekretion von APPs. Der inhibitorische Effekt war am deutlichsten in PMA-behandelten Zellen: Nur 25 % der enzymatischen Aktivität wurde festgestellt (Fig. 7B, Spuren 2 und 4; Fig. 7C). Folglich führte diese Punktmutation zu einer dominant negativen Form der Protease und zu einer deutlich verminderten konstitutiven und stimulierbaren α -Sekretaseaktivität.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 α -Sekretaseaktivität besitzt und in den basalen und stimulierten Prozeß des *Ectodomain Sheddings* von APP involviert ist. Diese Folgerung ergibt sich im wesentlichen aus folgenden experimentellen Ergebnissen:

- Die Überexpression der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 in HEK-Zellen führt zu einem Anstieg von APPs α und p10 um ein vielfaches. Der Anstieg in der Proteolyseaktivität (*Shedding*-Aktivität)

korreliert mit dem Expressionslevel der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10. Die verstärkte α -Sekretaseaktivität kann durch Stimulation der Proteinkinase C mit Phorbolestern erhöht werden, was ein charakteristisches Merkmal der α -Sekretase ist (HUNG et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, Seiten 22959-22962).

- Zelloberflächen-Biotinylierungsexperimente zeigen, daß die proteolytisch aktivierte Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 im wesentlichen in der Plasmamembranen lokalisiert ist.

- Die endogene basale und Phorbol ester stimulierte α -Sekretaseaktivität in HEK-Zellen kann durch eine dominant negative Form der Disintegrin Metalloprotease ADAM 10 deutlich inhibiert werden.

- Das Inhibitorspektrum sowohl des isolierten als auch des überexprimierten Enzyms stimmt mit den Berichten über die Hemmung der α -Sekretaseaktivität überein.

Auf die Veröffentlichung Lammich *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci USA (1999) 96,

3922-7 wird vollinhaltlich verwiesen.

Tabelle 2

Protein	Sequenz	% Spaltung durch Rinder-ADAM 10 nach	
		30 min	6 h
Pro-TNF	PLAQA↓VRSSSRTPSD-NH ₂	49	100
β-Amyloidvorläuferprotein	EVHHQK↓LVFFAEDVGSNK-NH ₂	28	69
	EVHHQK↓LVFFGEDVGSNK-NH ₂		
IL-6-Rezeptor	ANATLPVQ↓DSSSV-NH ₂	14	54
Angiotensin umwan- delndes Enzym	TPNSAR↓SEGPLPDSGR-NH ₂	0	0

Patentansprüche

1. Rekombinante Zelle, die ein Substratprotein exprimiert, das mindestens einen Sequenzbereich von 18 Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP, amyloid precursor protein) oder eines homologen Proteins umfaßt, wobei der Sequenzbereich die α -Sekretasespaltstelle sowie 6 Aminosäurereste aminoterminal und 12 Aminosäurereste carboxyterminal bezogen auf die α -Sekretasespaltstelle enthält, und
 - a) entweder rekombinante Nukleinsäure enthält, umfassend mindestens ein Gen für ein Proteaseprotein, das entweder mindestens den/die für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich oder Sequenzbereiche der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier umfaßt oder ein Mutein einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 darstellt, das im wesentlichen die gleichen enzymatischen Eigenschaften besitzt, wobei das Gen oder die Gene unter der Kontrolle eines heterologen Promotors stehen,
 - b) oder heterologe RNA codierend für ein Substratprotein und für ein Proteaseprotein.
2. Rekombinante Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie rekombinante Nukleinsäure enthält, umfassend entweder
 - a) mindestens ein Gen für ein Substratprotein, das mindestens einen Sequenzbereich von 18 Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP, amyloid precursor protein) oder eines homologen Proteins umfaßt, wobei der Sequenzbereich die α -Sekretasespaltstelle sowie 6 Aminosäurereste aminoterminal und 12 Aminosäurereste carboxyterminal bezogen auf die α -Sekretasespaltstelle enthält, und
 - b) mindestens ein Gen für ein Proteaseprotein, das entweder mindestens den/die für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich oder Sequenzbereiche der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier umfaßt oder ein Mutein einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 darstellt, das im wesentlichen die gleichen enzymatischen Eigenschaften besitzt, wobei das Gen oder die Gene unter der Kontrolle eines heterologen Promotors stehen,oder heterologe RNA codierend für ein Substratprotein und für ein Proteaseprotein.
3. Zelle nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Proteaseprotein die Di-

integrin-Metalloprotease ADAM 10 der Maus ist.

4. Zelle nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Proteaseprotein die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 der Ratte ist.
5. Rekombinante Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie rekombinante Nukleinsäure(n) enthält, die codieren:
 - c) für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier und
 - d) gegebenenfalls für ein Substratprotein gemäß Anspruch 2.
6. Zelle, nach Anspruch 5, wobei es sich bei der dominant negativen Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 um die Mutante E384A der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind oder um eine entsprechende Mutante aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier handelt.
7. Zelle nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Substratprotein ein Fusionsprotein ist, bei dem der aminoterminal Sequenzbereich des Fusionsproteins von einem Markerprotein, einem Enzym oder einem katalytisch wirksamen Teil eines Enzyms und der carboxyterminale Sequenzbereich des Fusionsproteins von dem humanen Amyloidvorläuferprotein oder einem Teil des humanen Amyloidvorläuferproteins gebildet werden.
8. Zelle nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Enzym um eine um mindestens 24 Aminosäurereste carboxyterminal verkürzte alkalische Phosphatase SEAP handelt.
9. Zelle nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Substratprotein eine Sequenz gemäß SEQ ID-No:1 aufweist.
10. Verfahren zur Auffindung pharmazeutischer Wirksubstanzen, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte
 - e) Bereitstellung eines Substratproteins gemäß Anspruch 2,
 - f) Bereitstellung eines Proteaseproteins gemäß Anspruch 2,
 - g) Applikation einer Testsubstanz auf eine Zelle, auf eine Zellfraktion oder auf ein Gemisch von Zellfraktionen, die jeweils sowohl das Substratprotein als auch das Protea-

seprotein umfassen, und

- h) Quantitative Bestimmung eines seit der Applikation der Testsubstanz gebildeten Proteolyseproduktes des Substratproteins.
11. Verfahren zur Auffindung von weiteren Sekretasen oder von pharmazeutischen Wirksubstanzen, umfassend die folgenden Schritte
 - d) Expression eines Substratproteins und einer dominant negativen Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier in einer Zelle gemäß Anspruch 5 oder 6.
 - e) Expression eines weiteren Testproteins in der Zelle und/oder Applikation einer Testsubstanz auf die Zelle oder auf eine Zellfraktion dieser Zelle, und
 - f) Quantitative Bestimmung eines gebildeten Proteolyseproduktes des Substratproteins.
 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß die quantitative Bestimmung des Proteolyseproduktes durch einen enzymatischen Test erfolgt, bei dem von der katalytischen Aktivität einer Probe auf die Menge an einem bestimmten Proteolyseprodukt in der Probe geschlossen wird.
 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß die quantitative Bestimmung des Proteolyseproduktes durch einen spektroskopischen Test erfolgt, bei dem von der spektroskopischen Eigenschaft einer Probe auf die Menge an einem bestimmten Proteolyseprodukt in der Probe geschlossen wird.
 14. Verwendung von Substanzen, die die von der Zelle gebildete Proteinmenge oder die enzymatische Aktivität eines Proteaseproteins gemäß Anspruch 1 oder 2 beeinflussen, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere von *Morbus Alzheimer*.
 15. Verwendung eines Proteaseproteins gemäß Anspruch 1 oder 2 zur proteolytischen Spaltung eines Substratproteins gemäß Anspruch 1 oder 2.
 16. Verwendung einer dominant negativen Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier oder einer Nukleinsäure, codierend für eine dieser dominant negativen Formen, zur Unterdrückung der α -Sekretaseaktivität einer Zelle.
 17. Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbe-

sondere für *Morbus Alzheimer*, dadurch gekennzeichnet, daß

- c) eine DNA-Probe der Testperson unter Einsatz genspezifischer Primer gegen die humane Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 der PCR-Analyse unterworfen wird,
- d) und die Sequenz des Amplifikationsproduktes mit der bekannten Sequenz der humanen Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 verglichen wird.

18. Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer*, durch quantitative Bestimmung der mRNA-Mengen von humanem ADAM 10 aus Zell- und Gewebeproben, umfassend einen der folgenden Schritte:

- d) Isolierung und Quantifizierung der ADAM 10-mRNA,
- e) Einzel- oder doppelsträngige cDNA die ADAM 10-mRNA umgeschrieben wird welche dann quantifiziert wird,
- f) die ganze Nukleotidsequenz von ADAM 10 oder Teile davon zur Quantifizierung mittels Hochdurchsatz-Expressionsanalyse (z.B. DNA-Chip-Technologie u. DNA-Micro-Array) eingesetzt wird.

19. Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer*, dadurch gekennzeichnet, daß die tatsächliche chromosomalen Lokalisierung des Gens der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 mit seiner normalen chromosomalen Lokalisierung, Chromosom 15 bei 12.44 cR₃₀₀₀, verglichen wird.

20. Arzneimittel, enthaltend eine rekombinante Nukleinsäure, die für ein Proteaseprotein gemäß Anspruch 1 oder 2 codiert.

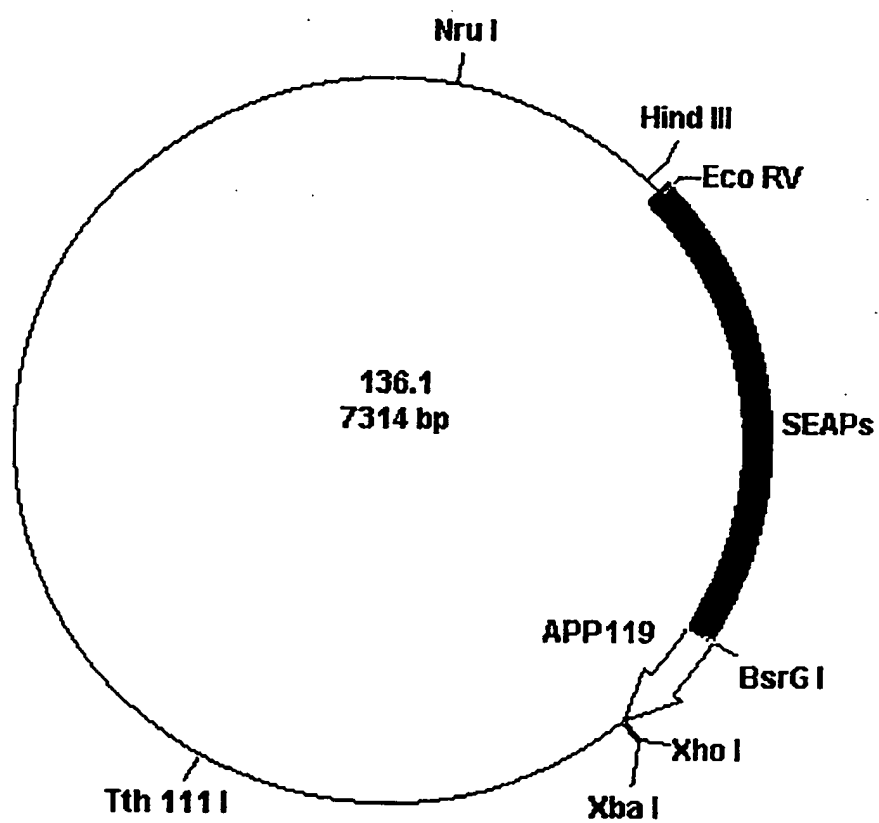
21. Arzneimittel, enthaltend eine zu einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers codiert, mindestens über einen Abschnitt von 10 Basen komplementäre rekombinante Nukleinsäure

22. Arzneimittel, umfassend die nicht-membranverankerte lösliche Form eines Proteaseproteins gemäß Anspruch 1 oder 2, insbesondere die lösliche Form von humanem ADAM 10.

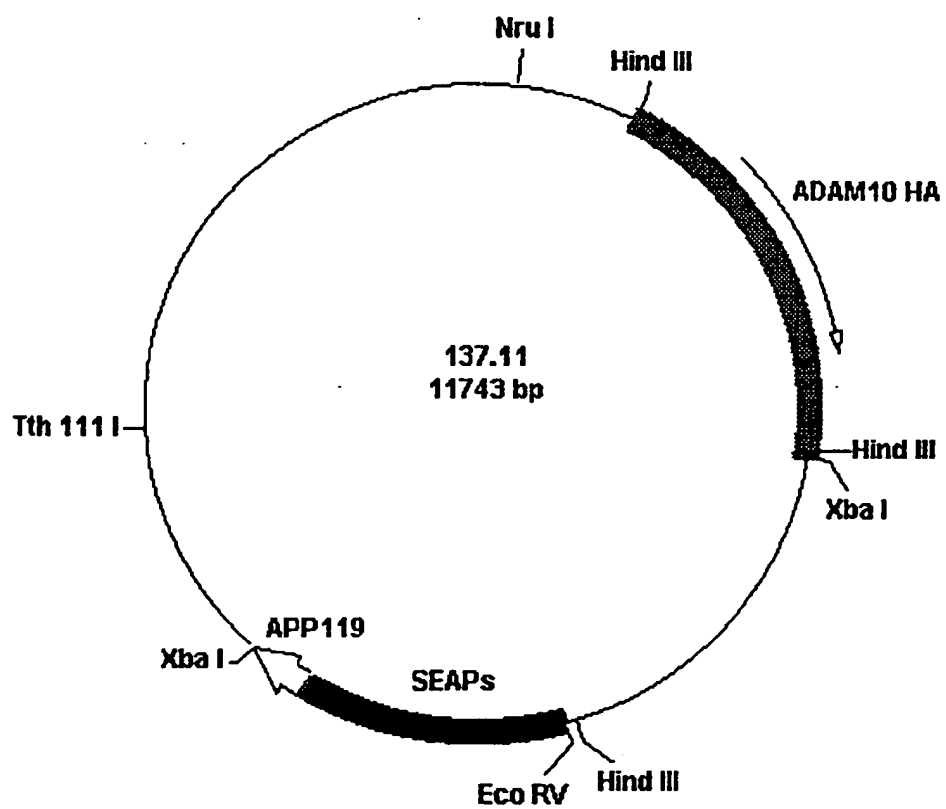
23. Antikörper oder Antikörperderivate, die ein Proteaseprotein gemäß Anspruch 1 oder 2

spezifisch binden.

24. Verfahren zur Bestimmung des Aktivitätszustands von humanem ADAM 10 durch Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades von humanem ADAM 10 in Zell- und Gewebeproben, wobei entweder
 - c) ADAM 10 isoliert wird und sein Phosphorylierungsgrad entweder durch Massenspektrometrie, durch spezifische Anti-Phosphothreonin-Antikörper, durch Quantifizierung der Aminosäure Phosphothreonin oder durch Dephosphorylierung (Phosphatase-Assay) von ADAM 10 bestimmt wird, oder
 - d) Zell- oder Gewebeproben direkt in eine Proteomanalyse eingesetzt werden und der Nachweis von phosphoryliertem ADAM 10 wie unter Punkt a) beschrieben erfolgt.
25. Transgenes nicht-menschliches Tier, das rekombinate Nukleinsäure, codierend für ein Proteaseprotein gemäß Anspruch 1 oder 2 oder für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier aufweist.
26. Verwendung einer rekombinanten Nukleinsäure, codierend für ein Proteaseprotein gemäß Anspruch 1 oder 2 oder für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier zur Erzeugung transgener Zellen und transgener nicht-menschlicher Tiere und zur Gentherapie.
27. Transgenes nicht-menschliches Tier, aufweisend eine zu einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers codiert, mindestens über einen Abschnitt von 10 Basen komplementäre rekombinante Nukleinsäure.
28. Verwendung einer zu einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers codiert, mindestens über einen Abschnitt von 10 Basen komplementäre rekombinante Nukleinsäure zur Erzeugung von transgenen Zellen und transgenen nichtmenschlichen Tieren und zur Gentherapie.

**Fig.1**

136.1 = pcDNA3-SEAPs/APP119

**Fig.2**

137.11 = pcDNA3-SEAPs/APP119_ADAM10-HA

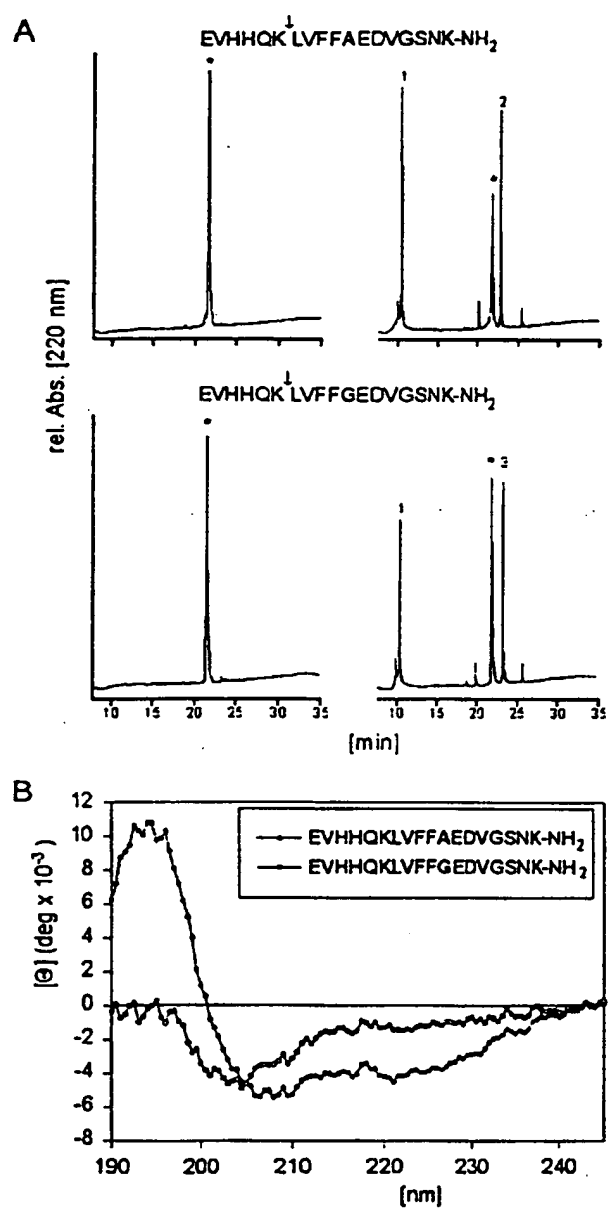


Fig. 3

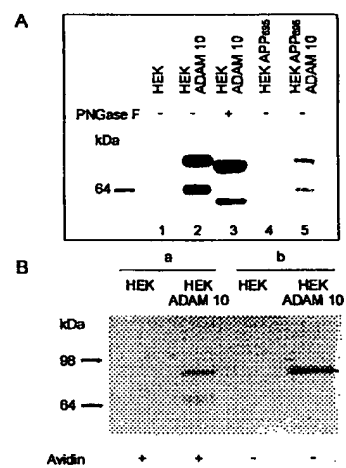


Fig.4

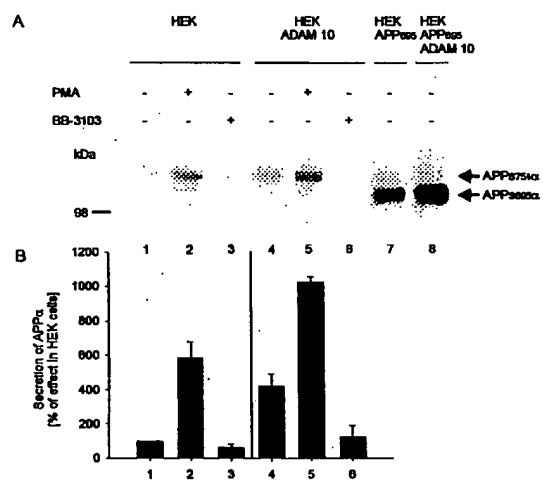


Fig. 5

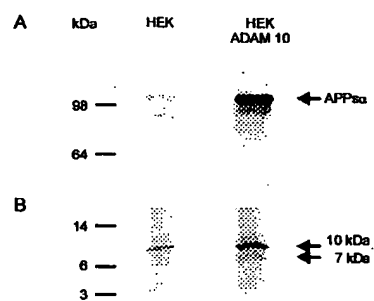


Fig. 6

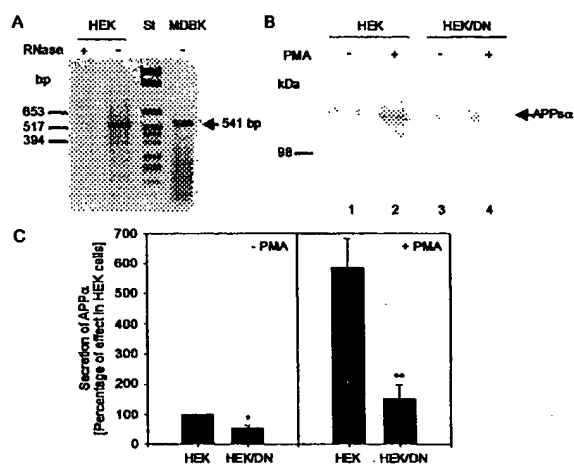


Fig. 7

SEQUENZPROTOKOLL

ALLGEMEINE ANGABEN:

ANMELDER:

NAME: Professor Falk Fahrenholz
STRASSE: Becherweg 30
BUNDESLAND: Rheinland-Pfalz
LAND: Deutschland
POSTLEITZAHL: 55099
TELEFON: 06131395833
TELEFAX: 06131395348

BEZECHNUNG DER ERFINDUNG: Zellen, die ein Amyloidvorläuferprotein und eine alpha- Sekretase coexprimieren, ein Testverfahren zur Identifikation alpha-Sekretase-aktiver Substanzen sowie eines zur Identifikation weiterer Sekretasen, ein Testverfahren zur Bestimmung der Anfälligkeit gegenüber Morbus Alzheimer und Verwendung von Nukleinsäuren, die für eine alpha-Sekretase codieren, für die Gentherapie

ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

COMPUTERLESBARE FASSUNG:
DATENTRÄGER: Diskette
COMPUTER: IPM-kompatibel
BETRIEBSSYSTEM: WINDOWS NT
SOFTWARE: WORD97

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:1:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 627 Aminosäuren
ART: Aminosäure
TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: Protein

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-No:1:

Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu	Gln	Leu	Ser	5	10	15
Leu	Gly	Ile	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asn	Pro	Asp	Phe	Trp	Asn	20	25	30
Arg	Glu	Ala	Ala	Glu	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Lys	Lys	Leu	Gln	Pro	35	40	45
Ala	Gln	Thr	Ala	Ala	Lys	Asn	Leu	Ile	Ile	Phe	Leu	Gly	Asp	Gly	50	55	60
Met	Gly	Val	Ser	Thr	Val	Thr	Ala	Ala	Arg	Ile	Leu	Lys	Gly	Gln	65	70	75
Lys	Lys	Asp	Lys	Leu	Gly	Pro	Glu	Ile	Pro	Leu	Ala	Met	Asp	Arg	80	85	90
Phe	Pro	Tyr	Val	Ala	Leu	Ser	Lys	Thr	Tyr	Asn	Val	Asp	Lys	His	95	100	105
Val	Pro	Asp	Ser	Gly	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Tyr	Leu	Cys	Gly	Val	110	115	120
Lys	Gly	Asn	Phe	Gln	Thr	Ile	Gly	Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	Arg	Phe	125	130	135
Asn	Gln	Cys	Asn	Thr	Thr	Arg	Gly	Asn	Glu	Val	Ile	Ser	Val	Met	140	145	150
Asn	Arg	Ala	Lys	Lys	Ala	Gly	Lys	Ser	Val	Gly	Val	Val	Thr	Thr	155	160	165
Thr	Arg	Val	Gln	His	Ala	Ser	Pro	Ala	Gly	Thr	Tyr	Ala	His	Thr	170	175	180
Val	Asn	Arg	Asn	Trp	Tyr	Ser	Asp	Ala	Asp	Val	Pro	Ala	Ser	Ala	185	190	195
Arg	Gln	Glu	Gly	Cys	Gln	Asp	Ile	Ala	Thr	Gln	Leu	Ile	Ser	Asn	200	205	210
Met	Asp	Ile	Asp	Val	Ile	Leu	Gly	Gly	Gly	Arg	Lys	Tyr	Met	Phe	215	220	225
Arg	Met	Gly	Thr	Pro	Asp	Pro	Glu	Tyr	Pro	Asp	Asp	Tyr	Ser	Gln	230	235	240
Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Gly	Lys	Asn	Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Leu	245	250	255
Ala	Lys	Arg	Gln	Gly	Ala	Arg	Tyr	Val	Trp	Asn	Arg	Thr	Glu	Leu	260	265	270
Met	Gln	Ala	Ser	Leu	Asp	Pro	Ser	Val	Thr	His	Leu	Met	Gly	Leu	275	280	285
Phe	Glu	Pro	Gly	Asp	Met	Lys	Tyr	Glu	Ile	His	Arg	Asp	Ser	Thr	290	295	300
Leu	Asp	Pro	Ser	Leu	Met	Glu	Met	Thr	Glu	Ala	Ala	Leu	Arg	Leu	305	310	315
Leu	Ser	Arg	Asn	Pro	Arg	Gly	Phe	Phe	Leu	Phe	Val	Glu	Gly	Gly	320	325	330
Arg	Ile	Asp	His	Gly	His	His	Glu	Ser	Arg	Ala	Tyr	Arg	Ala	Leu	335	340	345
Thr	Glu	Thr	Ile	Met	Phe	Asp	Asp	Ala	Ile	Glu	Arg	Ala	Gly	Gln	350	355	360
Leu	Thr	Ser	Glu	Glu	Asp	Thr	Leu	Ser	Leu	Val	Thr	Ala	Asp	His	365	370	375
Ser	His	Val	Phe	Ser	Phe	Gly	Gly	Tyr	Pro	Leu	Arg	Gly	Ser	Ser	380	385	390

Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr	395	400	405
Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Val Leu Lys Asp	410	415	420
Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly Ser Pro Glu	425	430	435
Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr His Ala	440	445	450
Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu	455	460	465
Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala	470	475	480
Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro	485	490	495
Pro Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Val Tyr Thr Arg	500	505	510
Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu	515	520	525
Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val	530	535	540
His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn	545	550	555
Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala	560	565	570
Thr Val Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr	575	580	585
Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr	590	595	600
Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu	605	610	615
Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn	620	625	

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:2:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 1884 Basenpaare
 ART: Nucleinsäure
 STRANGFORM: Einzelstrang
 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: c-DNA zu m-RNA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-No:2:

ATGCTGCTGC TGCTGCTGCT GCTGGGCTG AGGCTACAGC TCTCCCTGGG CATCATCCCA	60
GTTGAGGAGG AGAACCCGGA CTTCTGGAAC CGCGAGGCAG CCGAGGCCCT GGGTGCCGCC	120
AAGAAGCTGC AGCCTGCACA GACAGCCGCC AAGAACCTCA TCATCTTCCT GGGCGATGGG	180
ATGGGGGTGT CTACGGTGAC AGCTGCCAGG ATCCTAAAAG GGCAGAAGAA GGACAAACTG	240
GGGCTGAGA TACCCCTGGC CATGGACCGC TTCCCATATG TGGCTCTGTC CAAGACATAC	300

AATGTAGACA AACATGTGCC AGACAGTGGG GCCACAGCCA CGGCCTACCT GTGCGGGGTC	360
AAGGGCAACT TCCAGACCAT TGGCTTGAGT GCAGCCGCCC GCTTTTACCA GTGCAACACG	420
ACACGCGGCA ACGAGGTCAT CTCCGTGATG AATCGGGCCA AGAAAGCAGG GAAGTCAGTG	480
GGAGTGGTAA CCACCACACG AGTGCAGCAC GCCTCGCCAG CCGGCACCTA CGCCCACACG	540
GTGAACCGCA ACTGGTACTC GGACGCCGAC GTGCCTGCCT CGGCCCCGCA GGAGGGGTGC	600
CAGGACATCG CTACGCAGCT CATCTCCAAC ATGGACATTG ACGTGATCCT AGGTGGAGGC	660
CGAAAGTACA TGTTTCGCAT GGAACCCCA GACCCTGAGT ACCCAGATGA CTACAGCCAA	720
GGTGGGACCA GGCTGGACGG GAAGAATCTG GTGCAGGAAT GGCTGGCGAA GCGCCAGGGT	780
GCCCGGTATG TGTGGAACCG CACTGAGCTC ATGCAGGCTT CCCTGGACCC GTCTGTGACC	840
CATCTCATGG GTCTCTTTGA GCCTGGAGAC ATGAAATACG AGATCCACCG AGACTCCACA	900
CTGGACCCCT CCCTGATGGA GATGACAGAG GCTGCCCTGC GCCTGCTGAG CAGGAACCCC	960
CGCGGCTTCT TCCTCTTCGT GGAGGGTGGT CGCATCGACC ATGGTCATCA TGAAAGCAGG	1000
GCTTACCGGG CACTGACTGA GACGATCATG TTCGACGACG CCATTGAGAG GGCGGGCCAG	1060
CTCACCAGCG AGGAGGACAC GCTGAGCCTC GTCAGTCCG ACCACTCCCA CGTCTTCTCC	1120
TTCGGAGGCT ACCCCCTGCG AGGGAGCTCC ATCTTCGGGC TGGCCCCTGG CAAGCCCCGG	1180
GACAGGAAGG CCTACACGGT CCTCCTATAC GGAAACGGTC CAGGCTATGT GCTCAAGGAC	1240
GGCGCCCGGC CGGATGTTAC CGAGAGCGAG AGCGGGAGTC CGGAGTATCG GCAGCAGTCA	1300
GCAGTGCCCC TGGACGAAGA GACCCACGCA GGCGAGGACG TGGCGGTGTT CGCGCGCGGC	1360
CCGCAGGCGC ACCTGGTTCA CGGCGTGACG GAGCAGACCT TCATAGCGCA CGTCATGGCC	1420
TTCGCCGCTT GCCTGGAGCC CTACACCGCC TGCAGCCTGG CGCCCCCGC CGGCACCACC	1480
GACGCCGCGC ACCCGGGGGT GTACACTCGA CCAGGTTCTG GGTGACAAA TATCAAGACG	1540
GAGGAGATCT CTGAAGTGAA GATGGATGCA GAATCCGAC ATGACTCAGG ATATGAAGTT	1600
CATCATCAAA AATTGGTGTT CTTTGAGAA GATGTGGGTT CAAACAAAGG TGCAATCATT	1660
GGACTCATGG TGGGCGGTGT TGTCATAGCG ACAGTGATCG TCATCACCTT GGTGATGCTG	1720
AAGAAGAAAC AGTACACATC CATTATCAT GGTGTGGTGG AGGTTGACGC CGCTGTCACC	1780
CCAGAGGAGC GCCACCTGTC CAAGATGCAG CAGAACGGCT ACGAAAATCC AACCTACAAG	1860
TTCTTTGAGC AGATGCAGAA CTAG	